



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERÍSTICAS DE SÉMEN CANINO REFRIGERADO - COMPARAÇÃO ENTRE  
TRÊS DILUIDORES DIFERENTES

RAFAEL DE ASSUNÇÃO BRITO MENDONÇA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário Alexandre Gonçalves Quaresma

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Luísa Maria Leal Mateus

Coronel Med. Vet. Rui Manuel do

Sacramento Gonçalves

ORIENTADOR

Coronel Med. Vet. Rui Manuel do  
Sacramento Gonçalves

CO-ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Leal Mateus

2010

LISBOA





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERÍSTICAS DE SÉMEN CANINO REFRIGERADO - COMPARAÇÃO ENTRE  
TRÊS DILUIDORES DIFERENTES

RAFAEL DE ASSUNÇÃO BRITO MENDONÇA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário Alexandre Gonçalves Quaresma

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Luísa Maria Leal Mateus

Coronel Med. Vet. Rui Manuel do  
Sacramento Gonçalves

ORIENTADOR

Coronel Med. Vet. Rui Manuel do  
Sacramento Gonçalves

CO-ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Leal Mateus

2010

LISBOA

*“Aquele que se empenha a resolver as dificuldades  
resolve-as antes que elas surjam.  
Aquele que se dedica a vencer os inimigos  
triunfa antes que as suas ameaças se concretizem”*

Sun Tzu

Dedico esta tese à minha família pelo seu apoio incondicional,  
que sempre me motivou e inspirou para triunfar  
frente a todas as adversidades que têm surgido na minha vida!!!

## AGRADECIMENTOS

- Ao Sargento-Chefe Teixeira do Regimento de Lanceiros e ao Capitão Veterinário Rocha da GNR pela sua disponibilidade e esforço por dispensar os cães para a realização deste trabalho.
- Ao Coronel Veterinário Rui Gonçalves e ao Major Veterinário Pedro Brites pela partilha de conhecimentos da sua vasta experiência, e por permitirem por em prática muitos dos ensinamentos.
- Ao Capitão Veterinário André Fonseca por incutir o seu espírito trabalhador e incentivar a aprendizagem contínua.
- Ao Tenente Veterinário Paulo Morouço pela boa disposição constante, pela compreensão do que é ser estagiário e pelas dicas para a melhor aprendizagem nesta fase.
- À Professora Luísa Mateus pela sua dedicação ao ensino, pelo apoio incondicional e participação activa na realização deste trabalho, e pela permanente disponibilidade para esclarecimento de qualquer dúvida.
- À Dra. Isabel Alves pela partilha dos seus conhecimentos na área, e que sem a sua preciosa ajuda não teria sido possível realizar este trabalho.
- A todos os meus colegas de curso mais próximos, que juntos pudemos partilhar bons e maus momentos, e que o convívio vivido entre nós foi sem dúvida a maior fonte de conhecimentos adquiridos durante a vida académica.
- Aos meus camaradas de curso da Academia Militar: Paulo Dinis, Pedro Correia e Sénio Vaz, que ao longo de 7 anos tornaram-se amigos para toda a vida. Obrigado pelo apoio nos momentos difíceis e pelas alegrias no nosso convívio do dia a dia.
- Um especial agradecimento à minha grande amiga Ana Santos, que sempre me apoiou ao longo de todo o meu percurso académico, e que sempre me soube dar os melhores conselhos.
- Um agradecimento muito especial aos meus pais e irmão, que como família sempre me proporcionaram as melhores condições, e foram a base de toda a minha formação. Com o seu carinho e amizade, foram fonte inesgotável de força e de inspiração e que sempre souberam fazer críticas construtivas nas devidas alturas.
- À minha namorada e companheira, a quem devo muito do que sou hoje. Pelo seu carinho, compreensão, amor e paciência constantes. Pelas palavras encorajadoras nos dias mais cinzentos, e pelo seu sorriso que me dá força para tudo.

## Características de sémen canino refrigerado - comparação entre três diluidores diferentes

### RESUMO

A conservação de sémen e inseminação artificial em cães tem vindo a ser uma prática crescente nos últimos anos. Com a selecção de linhagens de cães para trabalho, desporto e beleza, as trocas de material genético internacionalmente são inevitáveis. A refrigeração de sémen, para inseminação posterior, é o método mais prático e económico de realizar este intercâmbio.

No processo de conservação de sémen é imprescindível a adição de diluidores, e um dos componentes mais utilizados, devido às suas características, é a gema de ovo. No entanto, devido aos riscos biológicos associados a este produto, têm surgido restrições do seu uso em alguns países. O objectivo deste estudo foi comparar a capacidade de conservação de sémen de cão proporcionada por três diluidores diferentes, em termos de motilidade, morfologia e integridade da membrana plasmática. Estes parâmetros foram avaliados diariamente, ao longo de 4 dias, em 9 ejaculados. Cada ejaculado foi dividido em três partes, que foram diluídas em diluidores diferentes (tris-gema de ovo, tris-leite 25% ou tris-leite 50%) e conservadas a 4 – 5°C.

A motilidade progressiva dos espermatozóides, ao fim dos 4 dias, foi significativamente melhor no diluidor tris-gema de ovo (54,7%) do que no tris-leite 25% (43,8%) ou no tris-leite 50% (40,4%). Em relação à percentagem de espermatozóides vivos e normais, foi também o diluidor tris-gema de ovo que apresentou melhores resultados (75,8%), comparativamente ao diluidor tris-leite 25% (66,2%) e tris-leite 50% (67,1%), sendo esta diferença significativa. A avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides foi realizada por intermédio do teste hipo-osmótico, não se tendo verificado diferenças significativas entre diluidores.

O diluidor tris-gema de ovo aparenta ser superior aos outros diluidores testados, na conservação de sémen de cão durante a refrigeração. No entanto, o diluidor tris-leite (numa concentração entre 25% a 50% v/v) também apresentou bons resultados, demonstrando ser um potencial substituto nos casos de envio de sémen para países em que a entrada de componentes de ovo está interdita.

**Palavras-chave:** cão, sémen refrigerado, diluidores, tris-gema de ovo, tris-leite

## Properties of chilled canine semen – comparison of three different extenders

### ABSTRACT

Semen preservation and artificial insemination in dogs has become a common practice in the last years. With breeding selection for work, sports and beauty, the international exchange of genetic material are inevitable. In these cases, the use of chilled semen for artificial insemination is the most economical and practical method for doing it.

Chilled semen preservation needs the addition of extenders, being egg yolk one of the components most used. However, since it can be a biologic hazards, several countries have imposed restrictions of its use. The aim of this study was to compare three different extenders in terms of their effects on canine spermatozoa, as judged by characteristics such as motility, morphology and plasma membrane integrity. These parameters were assessed daily over 4 days in 9 ejaculates. Each ejaculate was divided into three parts, which were extended in different extenders (egg-yolk-tris, milk-tris 25% and milk-tris 50%) and stored at 4 – 5 °C.

The progressive motility of spermatozoa on the fourth day was significantly higher in egg-yolk-tris (54,7%) than in milk-tris 25% (42,8%) or in milk-tris 50% (40,4%). At the end of four days, the percentage of live and normal sperm was also significantly higher in the egg-yolk-tris extender (75.8%) than in milk-tris 25% (66.2%) and in milk-tris 50% (67.1%). The evaluation of plasma membrane integrity of spermatozoa was determined by hypo-osmotic test, and there were no significant differences between extenders.

The egg-yolk-tris extender seems to be superior to the other extenders tested, in preservation of dog semen at 4°C. However, the milk-tris extender (in a concentration (v/v) between 25% and 50%) also showed good results, providing to be a potential substitute in cases of shipment of semen to countries where the entry of egg components is forbidden.

**Key words:** dog, chilled semen, extenders, egg-yolk-tris, milk-tris

# ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	ii
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índice Geral .....	v
Lista de Figuras, Gráficos e Tabelas.....	vii
Lista de abreviaturas e símbolos .....	ix
Nota Prévia.....	1
Descrição das actividades de estágio .....	2
Revisão Bibliográfica .....	3
1. Fisiologia reprodutiva do cão.....	3
2. Razões para colheita de sémen .....	7
3. Técnicas de colheita de sémen .....	9
4. Avaliação do sémen.....	13
4.1. Volume .....	14
4.2. Cor .....	14
4.3. pH.....	14
4.4. Motilidade progressiva.....	15
4.5. Concentração/ Número total de espermatozóides .....	18
4.6. Morfologia.....	19
4.7. Citologia / Cultura microbiana.....	22
4.8. Fosfatase alcalina.....	24
4.9. Teste de turgescência hipo-osmótico .....	24
4.10. Analisador da Qualidade Espermática.....	25
4.11. Medição de constituintes do líquido seminal.....	25
4.12. Filtros, gradientes de centrifugação e coloração fluorescente.....	26
4.13. Teste de ligação à zona pelúcida.....	27
4.14. Teste de penetração no oócito e fertilização <i>in vitro</i> .....	28
5. Factores que influenciam a avaliação do sémen .....	30
6. Conservação de sémen .....	33
6.1. Diluidores .....	34
6.1.1. Soluções tampão .....	34
6.1.2. Substratos energéticos.....	34
6.1.3. Crioprotectores e estabilizadores de membrana .....	35
6.1.4. Anti-oxidantes .....	38
6.1.5. Protectores de membrana.....	39
6.1.6. Antibióticos .....	39
6.1.7. Proporções de diluição .....	39
6.1.8. Exemplos de diluidores .....	40
6.2. Refrigeração de sémen .....	41
6.3. Congelação de sémen.....	44
Estudo .....	49
1. Objectivos .....	49
2. Materiais e Métodos .....	49
2.1. Animais.....	49
2.2. Colheita e análise de sémen.....	49
2.3. Diluidores de sémen.....	50
2.4. Processamento e análise de sémen .....	51
2.5. Análise estatística.....	51



3.	Resultados .....	52
3.1.	Exame Físico e Ecográfico .....	52
3.2.	Qualidade do Sêmen .....	52
3.3.	Motilidade .....	53
3.4.	Vitalidade e Morfologia .....	57
3.5.	Integridade da Membrana Plasmática (THO).....	60
4.	Discussão .....	64
5.	Conclusão .....	70
	Bibliografia.....	71
	Anexos .....	76

# LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

## Lista de Figuras

Figura 1 - Espermatogénese.....	5
Figura 2 - Morfologia de um espermatozóide normal.....	19
Figura 3 - Aspiração da gema para inclusão no diluidor.....	50
Figura 4 – Espermatozóides com cauda enrolada (seta) característica após teste hipo-osmótico (x1000).....	61
Figura 5 – Espermatozóides com cauda enrolada (seta) característica após teste hipo-osmótico (x1000).....	61

## Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Variação da motilidade média, em cada diluidor, ao longo do tempo (n = 9 ejaculados).....	54
Gráfico 2 - Variação da motilidade média, em cada diluidor, ao longo do tempo (n = 9 ejaculados).....	54
Gráfico 3 - Motilidade média do sémen refrigerado durante 4 dias em diluidor tris-gema de ovo.....	55
Gráfico 4 - Velocidade média dos spz ao longo do tempo, nos 3 diluidores diferentes. Velocidade 3=rápida; Velocidade 2=moderada; Velocidade 1=lenta; Velocidade 0=parado.....	56
Gráfico 5 -Motilidade média do sémen refrigerado durante 4dias em diluidor tris-leite 25%.....	56
Gráfico 6 -Motilidade média do sémen refrigerado durante 4dias em diluidor tris-leite 50%.....	57
Gráfico 7 - Variação da média dos spz vivos e morfológicamente normais ao longo do tempo, nos 3 diluidores.....	58
Gráfico 8 - Variação da média dos spz vivos e morfológicamente normais ao longo do tempo, em cada diluidor.....	58
Gráfico 9 - Percentagem de spz vivos e morfológicamente normais de cada ejaculado, refrigerado durante 4 dias no diluidor tris-gema de ovo.....	59
Gráfico 10 - Percentagem de spz vivos e morfológicamente normais de cada ejaculado, refrigerado durante 4 dias no diluidor tris-leite 25%.....	59
Gráfico 11 - Percentagem de spz vivos e morfológicamente normais de cada ejaculado, refrigerado durante 4 dias no diluidor tris-leite 50%.....	60
Gráfico 12 - Variação da % de spz com membrana íntegra, estimada pelo teste hipo-osmótico nos 3 diluidores durante os 4 dias de refrigeração (n = 9 ejaculados).....	62
Gráfico 13 - Variação da % de spz com membrana íntegra, estimada pelo teste hipo-osmótico em cada diluidor, durante os 4 dias de refrigeração (n = 9 ejaculados).....	62
Gráfico 14 - Espermatozóides com membrana plasmática íntegra (% spz reagiram THO) conservados a 4 °C durante 4 dias no diluidor tris-gema de ovo.....	63
Gráfico 15 - Espermatozóides com membrana plasmática íntegra (%spz reagiram THO) conservados a 4 °C durante 4 dias no diluidor tris-leite 25%.....	64
Gráfico 16 - Espermatozóides com membrana plasmática íntegra (%spz reagiram THO) conservados a 4 °C durante 4 dias no diluidor tris-leite 50%.....	64

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Exemplos de alguns diluidores para refrigeração.....	41
Tabela 2 – Características do sémen fresco (n = 9 ejaculados).....	53
Tabela 3 – Motilidade (média + erro padrão) do sémen preservado nos 3 diluidores ao longo do tempo.....	53
Tabela 4 – Percentagem de espermatozóides vivos e morfológicamente normais (média + erro padrão) no sémen preservado nos 3 diluidores ao longo do tempo.....	57
Tabela 5 – Percentagem de espermatozóides com defeitos nas caudas, antes da realização do teste hipo-osmótico.....	60

Tabela 6 - Percentagem de spz com a membrana plasmática íntegra (média + erro padrão) nos 3 diluidores ao longo do tempo .....	61
Tabela 7 - Registos dos vários parâmetros dos ejaculados frescos .....	76
Tabela 8 - Registos da percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva e rectilínea .....	76
Tabela 9 – Registos da velocidade dos espermatozóides com motilidade .....	77
Tabela 10 - Registos da percentagem de espermatozóides vivos e com morfologia normal	78
Tabela 11 – Registo da percentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (avaliados pelo teste hipo-osmótico) .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico

cm – centímetro

FSH – Hormona folículo-estimulante

g - grama

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofina

I.A. – inseminação artificial

kg - Quilograma

LDL – lipoproteínas de baixa densidade

LH – Hormona luteinizante

mg – miligrama

min - minuto

mL – mililitro

mM - milimol

mm<sup>2</sup> – milímetro quadrado

mpr – motilidade progressiva e rectilínea

pH – potencial de hidrogénio

r – factor de correlação

seg - segundo

spz – espermatozóides

THO – Teste hipo-osmótico

U.I. – unidades internacionais

μL – microlitro

μm – micrómetro

< - inferior a

> - superior a

## NOTA PRÉVIA

Mais um dos sonhos da minha vida está prestes a realizar-se: ser Médico Veterinário.

Em Setembro de 2003 ingressei na Academia Militar, na única vaga disponível para o curso de Medicina Veterinária nesse ano. A partir de 1999, com a publicação da Portaria n.º 162/99, de 10 de Março, os estabelecimentos militares de ensino superior universitário foram autorizados a conferir diplomas de formação militar complementar de licenciatura na área da saúde, passando a admitir um número restrito de alunos para os cursos de Medicina Veterinária (assim como para os cursos de Medicina, Medicina Dentária e Ciências Farmacêuticas). Através de um Protocolo com a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, os alunos de Medicina Veterinária frequentam o curso na respectiva faculdade, ao mesmo tempo que, na Academia Militar adquirem a sua formação militar que, no final, lhes permite obter o referido diploma de formação militar complementar da respectiva licenciatura.

Durante a frequência do curso, entrou em vigor o acordo de Bolonha, e o grau de licenciatura deu origem ao mestrado integrado. Terminada a rigorosa formação militar pela Academia Militar, chega agora também o momento de terminar a não menos exigente formação médico-veterinária.

Com o meu interesse em clínica de pequenos animais, com especial ênfase para as áreas de Reprodução e Infecçologia, e querendo ao mesmo tempo que o tema da minha dissertação pudesse, de alguma forma, ser útil para o Exército, decidi realizar um estudo comparando a acção de 3 diluidores na conservação de sémen canino refrigerado.

Não só no Exército, como nos outros ramos das Forças Armadas (Força Aérea e Marinha), Guarda Nacional Republicana e Policia de Segurança Pública, os cães são uma ferramenta de trabalho muito útil. Estes cães são aplicados em busca (drogas, explosivos ou pessoas) ou em patrulha e manutenção de ordem pública. Como cães de trabalho, há critérios de selecção rigorosos na obtenção destes animais e que, por vezes, é difícil encontrar animais com as características/apetências que se pretendem para este tipo de aplicação. Talvez por falta de mercado, não há muitos criadores de cães em Portugal que se dediquem a reproduzir cães, com o intuito de se obter linhagens seleccionadas para trabalho, levando à necessidade de se adquirir este tipo de animais no estrangeiro, tornando todo este processo muito mais dispendioso. Porque não recorrer-se à importação de sémen refrigerado, oriundo de cães seleccionados para trabalho, e inseminarem-se cadelas com boas prestações no trabalho em que são aplicadas?

## DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DE ESTÁGIO

Na formação do Médico Veterinário militar é inculcida a capacidade de trabalhar nas várias áreas profissionais em qualquer momento, além da responsabilidade e rigor que lhe são exigidos. Como tal, durante o meu estágio de Medicina Veterinária, desempenhei funções nas quatro principais valências da Medicina Veterinária no Exército Português: Clínica de animais de companhia, Bromatologia, Defesa Biológica e Clínica de equinos.

O estágio curricular teve início em Outubro na Clínica de Canídeos do Exército, nos Olivais em Lisboa, com duração de cerca de 6 meses. Contrariamente ao que o nome indica, não se presta assistência apenas a cães militares, como também a cães e gatos que pertençam à família militar. O estágio abrangeu as áreas de medicina interna, cirurgia geral e imagiologia. Na parte de medicina interna foi-me permitido assistir às consultas, fazer colheitas de sangue, administrar fármacos e discutir os casos clínicos com o corpo clínico. Na cirurgia geral, além da preparação do animal para a cirurgia, desempenhei ainda o papel de ajudante de cirurgia e de anestesista. As cirurgias realizavam-se quase todos os dias, sendo a maioria ovariectomias, mastectomias e castrações. É de salientar a possibilidade que tive de participar em duas ressecções da cabeça do fémur, a extracção de um melanoma situado no palato de um cão e duas cistotomias para extração de urólitos. Em imagiologia acompanhei a realização de alguns Raios-X e ecografias.

Seguiram-se dois meses no Laboratório de Bromatologia e Defesa Biológica (LBDB), localizado também nos Olivais, Lisboa. Foi possível acompanhar de perto os processos de análise microbiológica de alimentos, desde a preparação das amostras e dos meios, técnicas de sementeira, contagens e avaliação final da qualidade. Integrei também a equipa do LBDB que procede às inspecções de apoio técnico das cozinhas das unidades militares a nível nacional. Realizei visitas a oito unidades, cujo objectivo era avaliar a qualidade e cumprimento dos pré-requisitos nos processos de recepção, armazenamento, produção e distribuição dos alimentos. Estas acções têm uma função avaliadora, mas também formadora, dos manipuladores na área da alimentação das unidades militares. Durante este estágio tive também a possibilidade de acompanhar de perto vários projectos que se estão a desenvolver no âmbito da defesa biológica.

Por fim, estou neste momento a continuar o estágio no Hospital de Solípedes do Exército, sediado em Mafra, por um período de dois meses. Acompanho os Médicos Veterinários militares deste hospital para adquirir alguns conhecimentos sobre clínica geral, medicina e cirurgia geral, imagiologia e siderotecnia. Os casos clínicos mais comuns até ao momento têm sido claudicações e vários traumatismos. Tem sido possível também fazer o acompanhamento reprodutivo das éguas, com ecografias para registo da fase do ciclo éstrico, como também para diagnóstico de gestação.

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1. FISIOLOGIA REPRODUTIVA DO CÃO

O sistema reprodutivo do cão é constituído por vários órgãos individuais, que actuam em conjunto com o objectivo de produzir espermatozóides (spz) e libertá-los no interior do tracto reprodutor da cadela. Para tal, está envolvido tanto o sistema neuro-endócrino (hipotálamo e hipófise anterior) como o sistema genital (Cunningham, 2002).

Este sistema neuro-endócrino regula o sistema reprodutivo do cão por complexos mecanismos de feedback, que envolvem o hipotálamo (produtor e secretor da hormona libertadora de gonadotrofina – (GnRH), decapeptídeo), a hipófise anterior e os testículos. A GnRH é secretada de forma pulsátil e actua directamente nas células gonadotróficas da hipófise anterior, estimulando-as a sintetizar e libertar gonadotrofinas – a hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH). A libertação destas gonadotrofinas é dependente do padrão pulsátil da secreção de GnRH, isto é, libertações irregulares e de baixa amplitude de GnRH levam à secreção de FSH, libertações de elevada frequência estimulam a libertação de LH (Cunningham, 2002).

Ao nível do testículo, a LH vai ligar-se aos receptores membranares das células de Leydig, estimulando-as a converter o colesterol em testosterona. Para que a espermatogénese ocorra normalmente, é essencial o estímulo de FSH e a presença de concentrações locais elevadas de testosterona e de dihidrotestosterona (produto da conversão da testosterona pela 5 $\alpha$ -redutase) nos testículos. A concentração de testosterona nos testículos é 50 a 100 vezes superior à sua concentração no sangue (Feldman & Nelson, 2004). No testículo, as células-alvo da testosterona são as células mióides peritubulares e as células de Sertoli, que envolvem e sustentam as células precursoras dos spz (Cunningham, 2002).

A FSH estimula indirectamente a espermatogénese, actuando sobre as células de Sertoli, regulando os processos de diferenciação das células germinativas e o desenvolvimento de spz (Feldman & Nelson, 2004).

Apesar de todo o envolvimento neuro-endócrino, Cunningham (2002) considera o testículo como o órgão fundamental do sistema reprodutor masculino, pois além de ser responsável pela produção de androgénios, é nele onde ocorre a espermatogénese.

Funcionalmente o testículo pode ser dividido em três partes. A parte do tecido intersticial, onde se encontram as células de Leydig, envolve e banha os túbulos seminíferos com um fluido rico em testosterona. A parte basal situa-se no interior dos túbulos seminíferos e contém as espermatogónias, que se vão dividindo por mitoses sucessivas. Por fim, também localizada no interior dos túbulos seminíferos, há a parte luminal constituída por um meio específico, no qual os espermatócitos sofrem meiose até originarem os espermatozóides

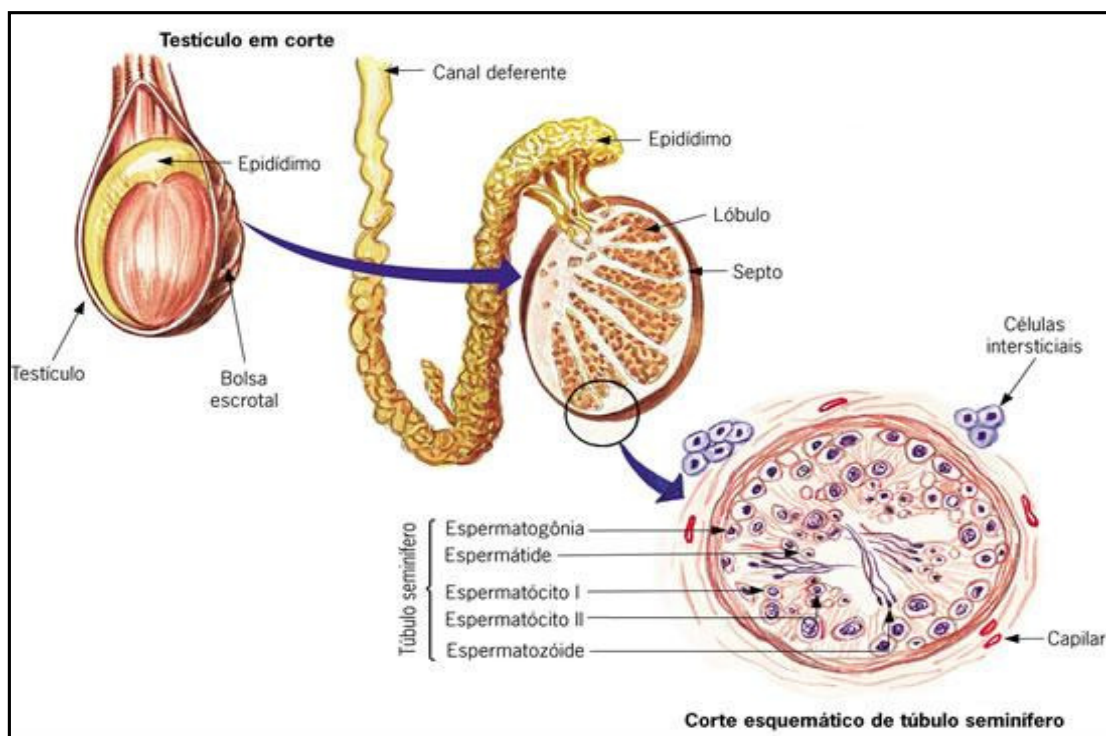
(Cunningham, 2002). A testosterona, além de ter um papel importante na promoção da espermatogénese, é também necessária para: a regulação das actividades de absorção e secreção dos ductos eferentes, deferentes e epidídimo; para o crescimento e manutenção da próstata; para a libido; e para o desenvolvimento das características sexuais secundárias (Feldman & Nelson, 2004).

A função testicular nos mamíferos domésticos é fortemente influenciada pela temperatura, exigindo um ambiente com temperatura inferior à corporal para que a espermatogénese ocorra normalmente. É por esta razão que nestas espécies os testículos estão situados no escroto, fora da cavidade abdominal. Por vezes, acontece que um ou os dois testículos não descem pelo anel inguinal até ao escroto, ficando retido(s) na cavidade abdominal, designando-se a estes animais de criptorquídicos. Estes testículos são incapazes de produzir spz normais dadas as temperaturas a que estão sujeitos. Portanto, quando a retenção é bilateral os animais são estéreis, contudo os testículos ainda têm a capacidade de síntese de androgénios (Cunningham, 2002).

Os túbulos seminíferos comunicam com a *rede testis*, para onde são encaminhados os spz e fluidos dos túbulos seminíferos, seguindo depois para o epidídimo. O epidídimo é uma estrutura tubular tortuosa, de comprimento considerável, que anatomicamente pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda. É nesta estrutura que os spz se vão concentrar e sofrer maturação. Os spz quando passam da *rede testis* para a cabeça do epidídimo são incapazes de fecundar um óvulo, necessitando por isso de passar por um processo denominado de maturação, que ocorre na cabeça e corpo do epidídimo. A cauda do epidídimo não é mais que o local de reserva de spz maduros, que comunica com os ductos deferentes, e estes por sua vez atravessam os anéis inguinais, entrando na cavidade abdominal onde se vão conectar à uretra prostática (Cunningham, 2002).

A espermatogénese (Figura 1) é um processo longo que pode ser dividido em três fases. Na primeira fase, designada de espermatocitogénese, ocorrem mitoses das células-tronco diplóides (espermatogónias) situadas na base dos túbulos seminíferos. Estas divisões sucessivas permitem a existência de um “stock” contínuo de espermatogónias, prontas a continuar o ciclo de diferenciação quando for necessário. Estas divisões são responsáveis pelos machos terem a capacidade de produzir spz continuamente, durante a sua vida adulta. Algumas destas espermatogónias dão origem a espermatogónias A, que continuam a sofrer mitoses, até se tornarem espermatogónias B, que voltam a sofrer mitoses até darem origem aos espermátócitos primários. Inicia-se depois a segunda fase, em que ocorre a meiose. Com a primeira divisão meiótica originam-se células haplóides, designadas espermátócitos secundários e em menos de um dia após a sua formação, ocorre a segunda divisão meiótica transformando os espermátócitos secundários em espermátides (Cunningham, 2002). Começa então a espermiogénese, a 3ª fase, em que as espermátides



**Figura 1 - Espermatogénese**

(adaptado de: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/figuras/Citologia2/espermatogenese2>)

já não se dividindo, continuam o processo de diferenciação até se tornarem espermatozóides. Este processo inclui a formação do acrossoma pelo aparelho de Golgi, a condensação e alongamento do núcleo, a formação do flagelo e a contracção do citoplasma (Ettinger & Feldman, 2010). Uma percentagem da produção de células espermáticas é perdida por degenerescência durante o decurso normal da espermatogénese (Cunningham, 2002). Embora a espermatogénese ocorra completamente nos testículos, a maturação dos spz só ocorre após estes atravessarem o epidídimo. Só para percorrer o comprimento do epidídimo, os spz do cão demoram entre 12 a 14 dias, sendo neste período que adquirem a capacidade de se deslocarem e que eliminam as gotas citoplasmáticas. No caso do cão, o tempo que decorre desde o início da formação dos spz até à sua completa maturação é de cerca de 62 dias (Ettinger & Feldman, 2010).

Os spz para culminarem o seu desenvolvimento, de modo a estarem aptos para fertilizarem os oócitos, ainda têm de sofrer alterações no interior do tracto reprodutor da cadela. Essas alterações fisiológicas denominam-se de capacitação e reacção do acrossoma (Witte et al., 2009). Quando os spz sofrem capacitação manifestam um padrão de motilidade alterado (com alterações na velocidade curvilínea e no deslocamento lateral da cabeça), a que se designa hiperactivação (Del Valle et al., 2009; Ponglowhapan, Essen-Gustavsson, & Linde Forsberg, 2004). Além de outras moléculas, sabe-se que a progesterona induz, fisiologicamente, a reacção do acrossoma nos spz de várias espécies de mamíferos,

inclusive os do cão (Witte et al., 2009). Alguns estudos já foram desenvolvidos para determinar a concentração necessária de progesterona para induzir a reacção do acrossoma *in vitro* (Witte & Schafer-Somi, 2007; Wu, Tsai, Lee, & Cheng, 2005). Outras partículas fundamentais para estas reacções são o colesterol e os iões de cálcio. A saída do colesterol e fosfolípidos da membrana plasmática dos spz é necessária para a capacitação destes, e um pré-requisito para que a reacção do acrossoma ocorra (Bergeron, Crete, Brindle, & Manjunath, 2004; Witte & Schafer-Somi, 2007; Witte et al., 2009). A entrada de iões de cálcio para o espaço intracelular é um passo crucial para que se processe a reacção do acrossoma (Aitken & McLaughlin, 2007; Witte et al., 2009). A membrana plasmática do espermatozóide funde-se com a membrana externa do acrossoma e, desta forma, o conteúdo enzimático do acrossoma é libertado por uma forma de exocitose modificada, permitindo que o espermatozóide penetre na zona pelúcida (Rijsselaere et al., 2005).

## 2. RAZÕES PARA COLHEITA DE SÉMEN

A colheita de sémen de um cão é necessária quando se pretende fazer um exame de reprodução mais completo, para situações de diagnóstico de alguma afecção que envolva o tracto reprodutor, para investigar sub-fertilidade ou infertilidade de um animal, ou nos casos de inseminação artificial a fresco ou após refrigeração ou criopreservação (Root Kustritz, 2007). Com a crescente popularidade das exposições de cães, de concursos de beleza, obediência e de desporto, pode vir a ser requerida aos veterinários a avaliação de sémen em exames de pré-compra ou antes da selecção do animal para reprodutor. O recurso a sémen refrigerado ou congelado para efectuar inseminação artificial também tem vindo a crescer nos últimos anos (Freshman, 2002; Michael et al., 2009), oferecendo a possibilidade de realizar trocas de material genético e assim melhorar os programas de criação de cães de trabalho, por exemplo (Abe et al., 2008).

A inseminação artificial é indicada quando há alterações na vagina da cadela que não permitam a cópula natural (ex. vagina estreita), estreitamento vestibulo-vaginal, septo vaginal, hiperplasia vaginal, ou devido à incompatibilidade comportamental entre o macho e a fêmea (Kutzler, 2005). A inseminação artificial também é recomendada quando os machos apresentam algum problema que lhes dificulte ou impossibilite a monta natural. Exemplos desses problemas são a artrite, fraqueza, grande diferença de tamanho entre o cão e cadela, defeitos na conformação do pénis, ou dor. Cães que sofram de ejaculação prematura, que sejam inexperientes, ou que apresentaram dificuldades em reproduzir-se na última vez, são também casos que podem necessitar de inseminação artificial para conseguirem reproduzir-se (Feldman & Nelson, 2004). No entanto, o motivo mais frequente é a distância física entre animais, em que o transporte de sémen é mais económico e menos stressante do que a deslocação de um dos animais, e em certos países a importação de sémen tem mesmo menos restrições do que a entrada de um animal vivo (Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005). Em vários países já estão estabelecidas regras para a importação de sémen, variando consoante o país de origem, e alguns impõem também regras para a exportação. Estas regras diferem do sémen refrigerado para o congelado. Para informação mais detalhada, está disponível no site [www.ivis.org](http://www.ivis.org) o artigo da Prof. Catharina Linde-Forsberg, "Regulations and Recommendations for International Shipment of Chilled and Frozen Canine Semen".

O sémen canino é também colhido para congelação (criopreservação), o que permite aos donos dos cães reprodutores preservar o património genético do animal e usá-lo quando o macho já não for fértil, esteja indisponível para reproduzir no momento ou já tenha falecido (Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005).

Alguns donos pretendem recorrer ao uso da inseminação artificial com o argumento de se evitar qualquer contacto venéreo entre o macho e a fêmea, controlando desta forma a propagação de algum agente infeccioso. Esta ideologia é correcta no que diz respeito à transmissão de doenças da cadela para o cão, mas o contrário já não é assim. O sémen ao ser depositado na vagina/útero da cadela é o elo de ligação, e alguns agentes infecciosos susceptíveis de serem transmitidos do cão para a cadela durante a monta natural, podem também ser transmitidos por inseminação artificial (Feldman & Nelson, 2004).

A inseminação artificial pode ser feita vaginal (no caso de sémen fresco ou refrigerado) ou intra-uterina (normalmente em casos de sémen congelado). A inseminação artificial intra-uterina pode ser realizada por intermédio de laparoscopia, por cirurgia (que envolve algum grau de stress para o animal, além dos riscos cirúrgicos e das questões éticas que se colocam), por intermédio dum cateter Norueguês ou com recurso ao endoscópio (Ettinger & Feldman, 2010).

Em clínica, segundo Kutzler (2005), é importante fazer avaliação do sémen previamente à utilização do cão para reprodução, sempre que: os machos sejam idosos (>12 anos de idade); os machos não tenham sido usados para reprodução durante vários anos; e machos que tenham história de cópulas infértéis ou de ninhadas pequenas (<3 cachorros em cadelas de raça média, <4 cachorros em cadelas de raça grande e gigante). Machos inteiros que apresentem corrimentos prepuciais anormais (hemorrágicos), hematúria, sangue no ejaculado ou outros sinais associados a doença prostática devem ser sujeitos a avaliação espermática, com particular interesse para a terceira fracção (secreção prostática) (Kutzler, 2005). Há, contudo, países que já impõem regras quanto à idade dos animais usados para reprodução, por exemplo em Portugal, o Clube Português de Canicultura não permite a reprodução de machos com idade superior a 12 anos.

### 3. TÉCNICAS DE COLHEITA DE SÉMEN

Antes de se efectuar a colheita, é importante a recolha de dados relacionados com o historial reprodutivo do animal em causa (quantas ninhadas, idade da última ninhada, período de descanso sexual, etc.), com a sua história clínica e administração de algum fármaco ou suplementos pelo menos nos últimos 6 meses (Freshman, 2002), e especialmente se têm sido administrados esteróides anabólicos (Blendinger, 2007a).

Entre as várias técnicas existentes, o método mais comum para recolha de sémen é o de estimulação manual, sendo necessários pelo menos 2 tubos de centrifugação para colher o sémen, um para a primeira e segunda fracções e outro para a terceira fracção (Kutzler, 2005). Os tubos deverão ser de plástico (e não vidro) para evitar que se quebrem, transparentes e graduados para permitirem a medição do volume colhido (Feldman & Nelson, 2004). É recomendável o uso de um cone de colheita com o tubo de centrifugação acoplado, para minimizar a perda de gotas da fracção rica em espermatozóides na fase da colheita. Cones de látex para a colheita de sémen (vaginas artificiais) são os mais comumente usados com o método da estimulação manual (Kutzler, 2005). Há autores que recomendam a aplicação de pequenas quantidades de lubrificante apenas no rebordo superior da vagina artificial, para diminuir a fricção no pénis e desta forma evitar a lesão de vasos superficiais, tendo cuidado para que o lubrificante não entre em contacto com o sémen (pode interferir com a vitalidade/viabilidade dos spz) (Ettinger & Feldman, 2010; Feldman & Nelson, 2004). A principal desvantagem no uso destes cones é a necessidade duma limpeza e lavagem cuidada entre utilizações, de modo a não haver resíduos de desinfectantes e de água na próxima utilização (Kutzler, 2005). No entanto, já há estudos que demonstram que o látex (de luvas e vaginas artificiais) tem efeitos prejudiciais sobre a motilidade dos espermatozóides, quando em contacto prolongado. Este problema pode ser reduzido se as técnicas de colheita forem bem executadas, havendo ainda a alternativa do uso de luvas de vinil e de vaginas artificiais descartáveis de polipropileno, com efeitos mínimos sobre a motilidade espermática, embora o uso destas últimas seja mais difícil do que as vaginas de látex convencionais (Althouse, Ko, Hopkins, & Evans, 1991; Freshman, 2002; Johnston et al., 2001). No entanto, há autores que consideram que esta interferência do látex não é clinicamente relevante (Feldman & Nelson, 2004; B. Lopes, Cunha, Silva, Vidal Junior, & Vianna, 2008).

O método de colheita com recurso a vaginas artificiais não é o ideal se for necessária a realização de culturas a partir da amostra, uma vez que o ejaculado estará contaminado com a flora bacteriana existente no pénis e prepúcio (Kutzler, 2005).

Sob as condições ideais, a colheita de sémen por estimulação manual deve ser feita na presença de uma cadela em cio (poderá não ser da mesma raça que o macho, mas convém

que seja de tamanho aproximado), pois aumentará a probabilidade de se ter sucesso na colheita em casos de machos nervosos ou virgens (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005). A fêmea normalmente pode ser retirada da sala onde está a decorrer a colheita assim que a ejaculação comece (Feldman & Nelson, 2004). Devido à indisponibilidade frequente duma fêmea em cio no momento e local da colheita, já foram testadas alternativas com sucesso, entre as quais o recurso a zaragatoas de secreções vaginais de cadelas em cio. As zaragatoas depois de efectuadas, podem ser conservadas no congelador (-20 °C), e no momento da colheita do sémen apresenta-se a zaragatoa para o macho cheirar. Outra alternativa é o uso de feromonas sintéticas de cadela em cio (metil p-hidroxibenzoato) comercialmente disponíveis. Todas estas possibilidades apresentadas são apenas para facilitar e/ou melhorar a colheita de sémen, não sendo normalmente imprescindíveis para a sua realização (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005). Mais relevante é que qualquer procedimento ou distração que possa induzir ansiedade ao animal seja reduzido ou eliminado, pois o medo ou a dor vão inibir que o cão atinja uma erecção completa e ejacule. Assim, até mesmo o exame de estado geral, vacinas, colheitas de sangue ou qualquer outro procedimento stressante deve ser realizado apenas depois de concretizada a colheita de sémen (Freshman, 2002; Kutzler, 2005). A sala onde se realizam as colheitas deve ter um pavimento antiderrapante e ser sossegada, restringindo-se o acesso apenas às pessoas estritamente necessárias, evitar-se ruídos desnecessários e falar demasiado alto. Há animais que ficam ansiosos só com os flashes de máquinas fotográficas, ou simplesmente devido à presença das batas, ou do facto de estarem em ambiente desconhecido (Feldman & Nelson, 2004).

Inicia-se a colheita manual de sémen massajando vigorosamente o pénis do cão através do prepúcio, ao nível do bulbo peniano, até que se desenvolva uma erecção parcial (ingurgitamento inicial do bulbo peniano). Se estiver presente uma cadela em pró-estro ou estro, pode-se deixar o macho montar, desviando-se o pénis para a vagina artificial antes da penetração vaginal. O prepúcio é então rapidamente retraído caudalmente até passar o bulbo, onde se aplica uma pressão firme e constante com os dedos polegar e indicador. Nesta altura, movimentos ante-retrogrados do pénis são desaconselhados uma vez que podem levar à perda da erecção (Freshman, 2002; Kutzler, 2005). Caso o bulbo ingurgite muito rapidamente, a abertura prepucial não será suficientemente larga para permitir a sua passagem, sendo aconselhável nestes casos interromper o processo, deixar o animal relaxar durante alguns minutos até haver regressão da erecção, e depois recomeçar. Caso contrário, a erecção e ejaculação enquanto o bulbo ainda estiver no interior do prepúcio, causarão desconforto e dor ao animal, resultando numa colheita incompleta (Feldman & Nelson, 2004; Freshman, 2002; Kutzler, 2005).

Consoante o cão, após o pénis atingir a erecção completa, poderão ocorrer impulsos pélvicos de intensidade variável durante a colheita (Kutzler, 2005). A erecção é uma

condição psicossomática que envolve acções sincronizadas dos sistemas vascular, endócrino e neurológico. As artérias pudendas externa e interna sofrem vasodilatação mediada pelo sistema nervoso parassimpático, ao mesmo tempo que ocorre o relaxamento dos corpos cavernoso e esponjoso, resultando no ingurgitamento dessas estruturas com sangue. A acumulação sanguínea no local é potenciada pelo comprometimento do retorno venoso do corpo cavernoso, devido à contracção do músculo isquiocavernoso, o que vai provocar a ingurgitação do bulbo peniano e o alongamento e dilatação do pénis (Cunningham, 2002; Kutzler, 2005). A ejaculação iniciar-se-á logo após se exercer pressão caudalmente ao bulbo (Kutzler, 2005). Há autores que referem que algumas acções como coçar o peito do cão, estimular a zona perineal ou falar para encorajar o animal, pode ajudar na colheita (Blendinger, 2007a). A ejaculação é a expulsão vigorosa de sémen da uretra, induzida por um reflexo sacral que é mediado pelo parassimpático, que vai induzir contracções peristálticas dos músculos que envolvem a uretra, nomeadamente os bulboesponjosos, isquicavernosos e uretrais (Cunningham, 2002).

Após o desenvolvimento de uma erecção completa e da ejaculação das primeiras duas fracções, o cão tenderá a passar a pata traseira por cima do braço da pessoa que está a colher, sofrendo o pénis uma rotação de 180° caudalmente, mantendo-se a face dorsal do pénis, dorsalmente. Esta rotação é possível devido à torção do pénis na zona imediatamente caudal ao bulbo, dada a grande elasticidade nesta zona, e uma vez que o osso peniano impede a oclusão da uretra durante a erecção e torção. Deve-se continuar a exercer pressão firme no mesmo local, e ao mesmo tempo exercer uma ligeira tracção no sentido oposto ao cão (Freshman, 2002; Kutzler, 2005).

O ejaculado é normalmente composto por três fracções. A primeira, chamada de pré-espermática, tem origem na próstata e normalmente tem um aspecto translúcido ou ligeiramente turvo e a quantidade varia de 0,5 a 20 mililitros. É ejaculada durante 5 a 20 segundos e tem como função a limpeza da uretra. A segunda fracção (rica em spz), provém da cauda do epidídimo, é normalmente opaca, de cor leitosa, de 0,5 a 2 mL de volume e demora 30 segundos a 4 minutos a ser ejaculada. Estas duas fracções são normalmente colhidas juntas. A terceira fracção (fluido prostático) é normalmente translúcida e podem ser colhidos entre 10-80 mL. No entanto, esta porção do ejaculado deve ser colhida separadamente, pois só é utilizada quando se pretende fazer cultura, exame citológico ou para aumentar o volume da dose para inseminação artificial a fresco (Feldman & Nelson, 2004; Freshman, 2002). O sémen deve ser protegido de variações drásticas de temperatura, de agitações, água, detergentes e germicidas. Embora o esperma canino não sofra choque térmico por descida das temperaturas tão facilmente como o das outras espécies (ex. bovino, equino), já o mesmo não acontece a temperaturas altas. Desta forma deve tentar manter-se o sémen a uma temperatura que esteja entre a temperatura corporal (37°C) e a temperatura ambiente da sala (20°C) (Kutzler, 2005).

Após a recolha do sémen, é importante assegurar que a entrada do pénis para o interior do prepúcio ocorre normalmente. Ocasionalmente os pêlos do abdómen ou do prepúcio (principalmente em cães de pêlo longo) podem ficar presos entre a mucosa peniana e o orifício prepucial, ou até ocorrer inversão da camada externa do prepúcio, deixando o pénis exposto a desidratação e a traumas (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005). Em casos mais graves pode mesmo ocorrer parafimose, e caso não haja intervenção, poderá resultar em necrose do pénis (Feldman & Nelson, 2004). Qualquer destas situações causa dor ao animal e necessita de assistência, podendo ser evitadas com a aplicação de lubrificante não-espermicida no pénis aquando a colheita, tendo o cuidado que não entre em contacto com o ejaculado, uma vez que há muitos lubrificantes que interferem na motilidade espermática (Feldman & Nelson, 2004; Freshman, 2002; Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005). A erecção pode persistir durante algum tempo (10 a 60 minutos) após a ejaculação (Ettinger & Feldman, 2010).

Há várias situações que podem levar uma tentativa de colheita de sémen ao fracasso, entre as quais estão: a técnica de colheita mal executada, um macho demasiado nervoso ou agitado, interferência do dono ou defeitos do macho. Os erros mais comuns na execução da técnica são a falha na exteriorização do bulbo e força ou pressão excessiva exercida no pénis. No entanto, com a prática estas dificuldades técnicas são facilmente ultrapassadas (Feldman & Nelson, 2004).

Apesar de a estimulação manual ser o método mais utilizado para a colheita de sémen dos cães, métodos alternativos como a electroejaculação ou farmacológicos (hidroclorato de pilocarpina) já foram usados (Kutzler, 2005). Mais recentemente têm surgido vários estudos sobre a colheita de spz a partir do epidídimo, com particular importância nos casos de morte de cães reprodutores valiosos, ou com aplicação na protecção de espécies em vias de extinção. Nestes casos a colheita poderá ser feita por punção aspirativa, ou por orquiectomia (Martins, Padilha, Souza, & Lopes, 2009; Ponglowhapan, Chatdarong, Sirivaidyapong, & Lohachit, 2006; Yu & Leibo, 2002).



#### 4. AVALIAÇÃO DO SÉMEN

Para uma correcta avaliação do sémen de cão, é fundamental estabelecerem-se protocolos para ser possível comparar resultados entre diferentes laboratórios e, ao contrário do que acontece nos humanos, não há referências padronizadas para os períodos de colheita de sémen relativamente à actividade sexual nos cães. Nos homens, a recomendação para uma avaliação correcta do sémen é a realização de duas colheitas, em que a primeira é feita após um período de descanso sexual de 2 a 7 dias, e a segunda 7 a 21 dias após a primeira (Root Kustritz, 2007). Contudo, há autores que sugerem que no caso dos cães a colheita deverá ser feita depois de 4 ou 5 dias de repouso sexual, mas nunca a mais de 10 o que pode resultar num aumento de alterações morfológicas dos espermatozóides e numa diminuição da sua motilidade (Freshman, 2002). Quando o sémen colhido se destina para refrigerar, congelar ou para realizar inseminação artificial, pode ser benéfica a realização de duas colheitas com intervalo de 45 a 75 minutos entre elas. Apesar de o número de espermatozóides ser significativamente inferior na segunda colheita, as duas juntas têm em média mais 70% de espermatozóides do que só a primeira colheita (England, 1999).

Sendo o sémen constituído por células vivas, o indivíduo que manipule o sémen deverá ter cuidado no seu manuseamento, executando os procedimentos desde a colheita até à avaliação com a maior brevidade possível, de modo a evitar a morte ou alterações celulares resultantes do mau manuseamento (Feldman & Nelson, 2004). Há autores que, no caso de análise de amostras de sémen refrigeradas, recomendam que se acondicionem os tubos, onde se encontram as amostras, num recipiente de vidro cheio de água. Este método permite prevenir o choque térmico durante o processo de refrigeração, e também as variações de temperatura durante o período em que as amostras estão fora do frigorífico, para serem analisadas (Iguer-ouada & Verstegen, 2001).

Uma avaliação rotineira de sémen inclui a determinação de vários parâmetros entre os quais o volume, cor, pH da terceira fracção, percentagem da motilidade progressiva e rectilínea dos espermatozóides, concentração e número total de espermatozóides no ejaculado, percentagem de espermatozóides morfolologicamente normais e avaliação do fluido seminal (citologia e cultura microbiana). É importante que com a avaliação do sémen seja feito também o registo da história clínica do animal e de algum achado no exame de estado geral (Johnston et al., 2001).

#### 4.1. Volume

O volume do ejaculado não é verdadeiramente um parâmetro que caracterize a qualidade do sémen, uma vez que está dependente da quantidade de secreção prostática que é recolhida, da idade e tamanho do cão, e da frequência de ejaculações (Feldman & Nelson, 2004). De qualquer forma, é um dado fundamental para se poder calcular o número total de spz no ejaculado, sendo este último um importantíssimo dado referente à qualidade do sémen. No cão, o volume normal de sémen varia entre 1,0 e 80,0 mL (Johnston et al., 2001; Root Kustritz, 2007).

Um desafio no processamento do sémen de cão é o pequeno volume que se colhe em cada ejaculação, o que limita a possibilidade de experiências a grande escala (Farstad, 2008).

#### 4.2. Cor

A cor do sémen de cão normalmente é branca turva a opaca. A intensidade da opacidade depende da concentração de spz (Feldman & Nelson, 2004). As amostras que tenham uma coloração apenas turva, devem ser examinadas ao microscópio para certificar se efectivamente existem spz na amostra. Por vezes há ejaculados que não têm spz, mas dada a presença de grande quantidade de gotículas de gordura, bactérias e células inflamatórias, o seu aspecto a olho nu pode ser semelhante a um ejaculado normal (Johnston et al., 2001). Se apresentar uma coloração amarela indicia contaminação com urina ou exsudado inflamatório, se for verde pode haver presença de exsudado purulento. Quando há presença de sangue fresco a coloração é avermelhada, se for sangue já hemolisado dará um aspecto acastanhado ao ejaculado. As causas mais comuns da presença de sangue no ejaculado são afecções prostáticas ou lesões nos vasos sanguíneos do pénis (Freshman, 2002; Root Kustritz, 2007). Mas a hemorragia não implica necessariamente afecção, pois alguns machos que nunca copularam, ou que ficam muito tempo sem o fazer, podem apresentar uma coloração avermelhada do sémen com origem prostática (Feldman & Nelson, 2004). De qualquer forma, a quantidade de sangue que possa existir nos casos clínicos não afectará a motilidade espermática se estiver menos de 6 horas em contacto (Freshman, 2002). Amostras muito limpas normalmente indicam azoospermia (Johnston et al., 2001; Root Kustritz, 2007).

#### 4.3. pH

O pH deve ser medido com tiras que tenham um alcance de 5,5 a 8,0 com capacidade de medir em intervalos de 0,5. O pH da terceira fracção varia entre 6,0 e 7,4 normalmente. A determinação deste valor pode ser importante para a escolha de antibióticos nos cães com prostatite (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001).

#### 4.4. Motilidade progressiva

Para avaliar a motilidade progressiva de uma amostra de sémen, basta colocar uma gota de sémen não diluído entre uma lâmina e lamela, e observar ao microscópio com uma ampliação total de 100x ou 400x, fazendo uma avaliação subjectiva da percentagem de spz que se estão a movimentar vigorosamente para a frente, contando em 5 campos ópticos, pelo menos, um total de 200 spz (Root Kustritz, 2007). Os spz devem ser cuidadosamente avaliados individualmente quanto ao tipo de movimento, pois há vários tipos de motilidade que podem apresentar: 1) motilidade progressiva linear rápida, em que não é possível visualizar os movimentos em espiral da cabeça dos spz; 2) motilidade progressiva linear lenta, em que apesar de os spz se moverem a direito e para a frente, fazem-no a uma velocidade mais lenta, sendo possível por vezes observar o movimento de rotação ou em espiral dos spz, o que permite visualizar a porção achatada da cabeça dos spz. Isto pode ser provocado pelos diluidores, pelo líquido seminal ou pela descida de temperatura; 3) movimentos circulares, curvilíneos ou em S; 4) motilidade em zigzag, em que os spz apresentam movimentos de grande amplitude das cabeças, mas o deslocamento progressivo é muito ligeiro; 5) motilidade retrógrada, em que os spz se deslocam no sentido contrário ao da localização da cabeça, este tipo de movimento está muitas vezes associado a spz com peças intermédias ou caudas dobradas; 6) Movimentos vibratórios dos spz, são todos aqueles em que as células se movem mas não progridem em sentido nenhum.

Tipos de motilidade anormal estão associados a spz morfologicamente anormais e a fertilidade diminuída. No entanto, podem haver spz com defeitos morfológicos mas com a motilidade normal, daí a importância em avaliar também a morfologia (Ettinger & Feldman, 2010). Pode também ser feita uma avaliação da velocidade da motilidade, classificando-a como lenta, moderada ou rápida, sendo esta última a considerada normal, em que o espermatozóide demora entre 2 a 3 segundos a atravessar o campo de visão (Root Kustritz, 2007).

A avaliação da motilidade pode tornar-se muito difícil em amostras demasiado concentradas, sendo nestes casos recomendada a diluição do sémen na secreção prostática, ou em outro diluidor (Feldman & Nelson, 2004; Martinez, 2004). Algumas das preparações salinas usadas como diluidores, devido às variações de pH, podem levar a uma diminuição da motilidade progressiva dos spz (Johnston et al., 2001). Outros diluidores, por conterem substâncias viscosas como o caso da gema de ovo, pelo factor de diluição utilizado, assim como a temperatura a que é feita a análise, provocam alterações na velocidade dos spz e na linearidade dos seus movimentos (Schafer-Somi & Aurich, 2007). O valor normal da motilidade progressiva e rectilínea para o sémen de cão é de 70% ou mais (Johnston et al., 2001).

Como já foi referido anteriormente, há autores que defendem que o sémen de cão é resistente à diminuição de temperatura. Deste modo, a lâmina de microscópio não necessita

de ser aquecida. Contrariamente, outros dados publicados indicam que a descida de temperatura pode ter alguma influência negativa na motilidade (Freshman, 2002), principalmente se se tratar de sémen colhido no epidídimo, que demonstrou ser mais sensível à descida de temperatura do que o sémen ejaculado (Ponglowhapan et al., 2006; Yu & Leibo, 2002). Seja como for, flutuações rápidas da temperatura devem ser evitadas (Feldman & Nelson, 2004; Root Kustritz, 2007). A avaliação deste parâmetro deve ser realizada o mais rapidamente possível após a colheita, pois a motilidade diminui à medida que a luz do microscópio vai aquecendo a amostra na lâmina (Johnston et al., 2001). Além de todos os factores já mencionados que podem alterar a motilidade dos spz, a presença de água, urina, pus, sangue ou lubrificantes pode também ser deletéria (Blendinger, 2007a).

A percentagem de motilidade progressiva dos spz de um determinado cão não é afectada pela frequência a que as colheitas são realizadas (Root Kustritz, 2007). No entanto, o primeiro ejaculado, após um período prolongado de pausa na actividade sexual, pode conter uma grande quantidade de spz antigos e mortos que estavam armazenados no epidídimo, resultando numa diminuição significativa da percentagem de spz com motilidade progressiva na amostra (Feldman & Nelson, 2004).

Durante a avaliação da motilidade deve-se também avaliar a aglutinação dos spz, que é evidenciada quando estão vários spz “colados” uns aos outros. Há ainda artefactos que poderão influenciar os resultados da avaliação se não forem tidos em conta, nomeadamente o aumento da motilidade junto a bolhas de ar e a diminuição nos bordos da lâmina. Aglutinação de spz junto a bolhas de ar, detritos e partículas da gema do diluidor são também considerados artefactos (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001).

A percentagem de spz morfológicamente normais está correlacionada positivamente com a percentagem de spz com motilidade progressiva (Johnston et al., 2001; Root Kustritz, 2007), pois a motilidade é uma manifestação das competências estruturais e funcionais dos spz (Martinez, 2004; Volpe, Leoci, Aiudi, & Lacalandra, 2009). Contudo, é de salientar que a motilidade não é um parâmetro seguro para se avaliar a viabilidade do sémen conservado. Isto porque, já foi demonstrado que amostras de sémen cuja motilidade estava a diminuir durante a refrigeração, com a renovação do diluidor, a percentagem de spz com motilidade dessas mesmas amostras aumentou. Desta forma, pode-se concluir que se a baixa motilidade dos spz pode ser melhorada com suplementação do meio, *in vitro*, também o pode ser com a interacção com as secreções do tracto reprodutor feminino (Verstegen, Onclin, & Iguer-Ouada, 2005). No entanto, apesar de não ser o parâmetro que melhor indique a capacidade de fertilização dos spz, é um parâmetro de avaliação relativamente fácil, e que serve como orientação para avaliação de sémen fresco ou armazenado (L. LeFrappier, L. Walston, & Whisnant, 2010). E mesmo com o desenvolvimento da tecnologia e de técnicas mais objectivas para avaliar os spz, a motilidade progressiva continua a ser o indicador da função espermática mais utilizado. É inquestionável que a motilidade é

imprescindível para que os spz percorram os ovidutos e progridam até aos óvulos (Martinez, 2004).

Os espermatozóides morfológicamente normais que estejam imóveis podem ter sido colhidos ou avaliados com materiais contaminados, terem sido sujeitos a alterações de temperatura extrema de forma muito drástica ou, mais raramente, podem ter um flagelo funcionalmente anormal (Root Kustritz, 2007). Esta imobilidade do flagelo está descrita como a síndrome de Kartagener, e pode afectar outras células ciliares. É uma alteração genética autossómica recessiva, e que nos cães se pode manifestar por doenças do tracto respiratório, esterilidade nos machos, surdez e hidrocefalo (Blendinger, 2007a).

O sistema CASA (Computer-based automated semen analysis) funciona como um analisador computadorizado da motilidade e morfometria celular. Recentemente, já tem sido utilizado em vários estudos em sêmen de cão, embora não seja um equipamento que esteja disponível para a grande maioria dos veterinários clínicos (Iguer-ouada & Verstegen, 2001; Root Kustritz, 2007). Este equipamento, com um microscópio de contraste incorporado, permite avaliar muitos parâmetros de uma forma rápida e muito objectiva, incluindo: a percentagem de spz móveis; a “*velocity average pathway* (VAP)” --- que é a velocidade média de todo o percurso percorrido pelo espermatozóide, expressa em  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ; a “*velocity straight line* (VSL)” --- que é a velocidade média em linha recta, do ponto inicial ao final da trajectória, expressa em  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ; a “*curvilinear velocity* (VCL)” --- que é a média das várias velocidades instantâneas, medidas em vários pontos do percurso dos spz, em  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ; a linearidade (STR – “*straightness*”), que é uma estimativa da proximidade de uma trajectória percorrida por uma célula com uma linha recta, sendo uma média dos quocientes VSL/VAP, expressa em percentagem; e amplitude do deslocamento lateral da cabeça (Iguer-ouada & Verstegen, 2001; Rijsselaere et al., 2005). Outra vantagem deste tipo de equipamento é que podemos detectar pequenas alterações na motilidade dos spz, que seriam impossíveis de identificar pelos métodos de análise convencionais (Rijsselaere et al., 2005). Isto permite a categorização de sub-populações de spz na amostra que poderão reagir de modo diferente à criopreservação ou a outros processamentos (Root Kustritz, 2007).

Estes sistemas normalmente funcionam com a técnica de citometria de fluxo, o que permite não só a avaliação de diversos parâmetros simultaneamente, como também avaliar um grande número de spz (Farstad, 2008). Permitem também avaliar a motilidade dos spz, independentemente do estado do sêmen: fresco, refrigerado, descongelado e também após capacitação dos spz (Martinez, 2004).

A análise subjectiva da percentagem de spz com motilidade progressiva já foi comparada com este sistema de análise computadorizado, e os resultados obtidos tiveram boas taxas de correlação (Root Kustritz, 2007).

O grande problema dos CASA, além do seu elevadíssimo custo, é a necessidade da standardização e validação do sistema antes de qualquer utilização prática. Isto é

importante porque o sistema tem várias definições possíveis de serem reguladas, como o tempo de análise, intensidade de contraste, etc., que se não forem uniformizados para os diferentes estudos, podem determinar resultados diferentes no fim da avaliação (Rijsselaere et al., 2005; Schafer-Somi & Aurich, 2007). Rijsselaere et al (2005) relatam vários estudos em que se usou CASA que apresentaram discrepâncias significativas nos resultados por influência da proporção da diluição da amostra de sémen, do diluidor usado, da temperatura a que se realizou a análise e da câmara de contagem.

#### **4.5. Concentração/ Número total de espermatozóides**

A concentração de spz no ejaculado, à semelhança do volume, não é um parâmetro indicador da qualidade do sémen do cão, uma vez que também é dependente da quantidade da secreção seminal que é recolhida, podendo a concentração variar entre 4 a 400 milhões por mililitro. No entanto, para se calcular o número total de spz no ejaculado, que é o valor de interesse, é imprescindível a determinação quer da concentração quer do volume da amostra (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001).

Para determinar a concentração de spz no sémen de cão pode-se utilizar o sistema CASA ou um medidor de densidade óptico. Contudo, o *gold standard* continua a ser o método mais tradicional, através do uso da câmara de Neubauer (Root Kustritz, 2007).

Há uma outra técnica descrita para determinar a concentração de spz no sémen de outras espécies, em que as amostras são colocadas em câmaras de contagem de 10 µl, e comparadas com fotomicrografias *standard* de concentrações espermáticas definidas que variam de 100 a 1500 milhões por mililitro. No caso do cão, muitas das amostras têm concentrações inferiores a 100 milhões por mililitro, o que torna esta técnica pouco adequada para a espécie (Johnston et al., 2001; Root Kustritz, 2007).

O número total de spz existentes é calculado multiplicando a concentração (em milhões por mililitro) pelo volume colhido (em mililitros), e normalmente nos cães varia entre 300 milhões e 2 bilhões de espermatozóides no ejaculado. Este grande intervalo de valores normais reforça a ideia da produção espermática estar dependente da quantidade da massa testicular (Feldman & Nelson, 2004; Freshman, 2002; Johnston et al., 2001; Root Kustritz, 2007).

Uma única colheita de sémen não é suficiente para considerar um cão infértil ou sub-fértil, pois há vários factores que podem levar à diminuição do número total de spz, desde a apreensão, nervosismo do cão, ausência da cadela em cio durante a colheita, ou presença de dor na próstata, coluna ou membros posteriores (Johnston et al., 2001). A frequência de ejaculação afecta o número total de spz, pois após 7-10 dias de colheitas diárias, a reserva epididimária esgota-se, obtendo-se na próxima colheita o número de spz produzidos diariamente (Freshman, 2002; Root Kustritz, 2007). Este número é depois constante nas

ejaculações consequentes, rondando os 400 milhões de spz para a maioria dos cães (Feldman & Nelson, 2004).

Em amostras em que a quantidade de spz seja muito baixa, deve-se determinar a concentração de fosfatase alcalina para garantir que a colheita foi completa (ver mais à frente) (Johnston et al., 2001).

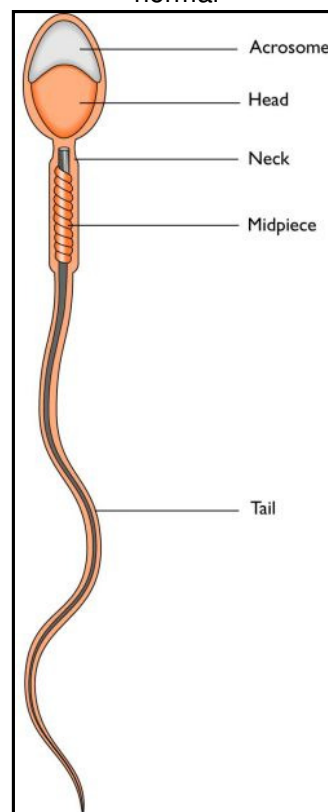
#### 4.6. Morfologia

A percentagem de spz morfolologicamente normais no sêmen de cão é considerada aceitável a partir de 70%. O espermatozóide normal é constituído por um acrossoma, cabeça, pescoço, peça intermédia e cauda (Figura 2). O acrossoma é uma estrutura de espessura uniforme, que cobre ligeiramente mais que a metade anterior da cabeça do espermatozóide. A peça intermédia tem aproximadamente o comprimento correspondente ao de uma cabeça e meia (Feldman & Nelson, 2004). Um espermatozóide canino normal, de qualquer raça, tem um comprimento total de 6,8  $\mu\text{m}$ , uma peça intermédia de 1,1  $\mu\text{m}$  e uma cauda com comprimento de 5,0  $\mu\text{m}$ , dividida na sua parte principal e porção final. Todo o espermatozóide direito ou ligeiramente curvo, que não apresente defeitos evidentes na cabeça, peça intermédia ou cauda, é considerado normal (Johnston et al., 2001). Oettle (1993) demonstrou que, nos cães, a percentagem de spz morfolologicamente normais está positivamente correlacionada com a taxa de fertilidade. Neste estudo, o valor mínimo aceitável para a percentagem de spz morfolologicamente normais foi de 60%. Segundo o autor, cães com um valor igual ou superior a este teriam uma taxa de concepção de 61%, enquanto os cães com uma percentagem de spz morfolologicamente normais inferior a 60% teriam uma taxa de concepção de apenas 13% (Oettle, 1993).

Para avaliar a morfologia dos spz ao microscópio óptico é necessário recorrer a corantes celulares. No caso do sêmen canino normalmente usa-se o eosina-nigrosina ou o Giemsa modificado (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001).

Para corar os spz com o eosina-nigrosina basta colocar uma gota de sêmen e outra de corante numa das extremidades duma lâmina para microscópio, e com o auxílio de outra lâmina ou lamela misturar as duas gotas com cuidado, e de seguida fazer um esfregaço e deixar secar ao ar (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001). A eosina-nigrosina é um corante

**Figura 2 - Morfologia de um espermatozóide normal**



(adaptado de:  
<http://img.tfd.com/vet/thumbs/gr358.jpg>)

vital, que vai realçar mais os contornos dos spz do que a célula propriamente dita (Blendinger, 2007a). Este corante associado ao microscópio de contraste permite também avaliar o estado do acrossoma dos spz vivos e mortos. Os vivos e com acrossoma intacto e normal, apresentam-se brancos sobre fundo escuro da nigrosina, com os bordos bem definidos e regulares. Os spz que estejam vivos mas o acrossoma tenha reagido apresentam a zona acrossómica com coloração escura, e sem a extremidade apical detectável (Martinez, 2004). O método de coloração descrito permite também diferenciar os spz vivos dos mortos, baseando-se no facto das células nas quais o corante (eosina) entra se considerarem mortas e as restantes vivas. Assume-se que os spz que ficam corados de rosa apresentam lesões a nível da membrana celular, e são por isso considerados não funcionais ou mortos (Root Kustritz, 2007).

Para a coloração com o Giemsa modificado é efectuado primeiro um esfregaço com uma gota de sémen não diluído, este é seco ao ar, e só depois é mergulhado nas diferentes soluções do corante, cerca de 5 minutos em cada uma (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001).

As lâminas devem ser secas só por aposição de papel absorvente, sem esfregar. Para minimizar os artefactos causados pela coloração deve secar-se as lâminas na platina do microscópio a 37 °C. No mínimo devem ser avaliados entre 100 a 200 espermatozóides ao microscópio óptico, com o auxílio de óleo de imersão, a uma ampliação total de 1000x (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001). Os spz devem ser observados no terço médio da lâmina, sendo estes os menos susceptíveis a alterações provocadas pela execução da técnica (Root Kustritz, 2007).

Está descrito ainda o uso do corante Spermac® que permite obter uma coloração rápida com características únicas, corando o núcleo dos spz de vermelho, o acrossoma, peça intermédia e cauda de verde, e a zona equatorial do acrossoma de verde-pálido (Feldman & Nelson, 2004), tornando-se muito útil no estudo da morfologia do acrossoma (Martinez, 2004; Monteiro et al., 2009).

Independentemente da técnica de coloração usada, há sempre alterações nos spz resultantes da sua execução, sendo as cabeças destacadas, caudas enroladas e dobradas e peças intermédias dobradas, os artefactos descritos mais regularmente. A consistência na técnica usada é fundamental para que as avaliações em série sejam o mais exactas e precisas possível (Johnston et al., 2001). O uso de corantes que não sejam osmoticamente semelhantes às suspensões espermáticas, resultam no destacamento do acrossoma de alguns spz. Este efeito osmótico é mais pronunciado em sémen descongelado do que no fresco (Martinez, 2004). A avaliação da morfologia dos spz idealmente deveria ser feita com microscópios de contraste, em que se coloca uma gota de sémen não diluído numa lâmina, cobrindo-se com uma lamela grande. Isto vai levar a que o líquido se espalhe numa camada fina, permitindo uma avaliação precisa dos spz individualmente sem recurso a corantes,



uma vez que as técnicas de coloração aumentam a ocorrência de defeitos (Feldman & Nelson, 2004). Mas este tipo de equipamento não está disponível para a grande maioria dos veterinários, tendo que se recorrer ao microscópio óptico (Root Kustritz, 2007). Os problemas de qualquer método de coloração, além dos já citados, são a incapacidade de classificar consistentemente os spz que se apresentam parcialmente corados, e a interferência do glicerol ou da gordura (presentes na maioria dos diluidores para conservação do sémen) com o corante (Rijsselaere et al., 2005).

Além das alterações resultantes do processamento, surgem também as que ocorrem ainda no tracto reprodutor do macho. Trauma testicular, febre ou infecção do tracto reprodutor são possíveis causas de alterações morfológicas dos spz, devido ao aumento da temperatura nos testículos. No entanto, estas alterações só serão verificadas algum tempo depois do problema inicial, uma vez que a espermatogénese no cão tem uma duração de cerca de 62 dias (Freshman, 2002; Johnston et al., 2001). Outras possíveis causas de alterações morfológicas dos spz são a diminuição da secreção de LH ou de testosterona, ou causas iatrogénicas. Cães saudáveis que mudam de dono ou de ambiente, podem mostrar um aumento transitório da quantidade de spz anómalos, possivelmente devido ao aumento endógeno de corticosteróides (Martinez, 2004).

A avaliação da percentagem de spz morfolologicamente normais é o único parâmetro consistente que fornece um valor reproduzível entre diferentes investigadores que avaliam esperma canino ou humano (Johnston et al., 2001), tendo já sido demonstrado que este parâmetro não é influenciado pela técnica de preparação usada (quando bem feita), nem pelo investigador que realize a avaliação. Assim como a motilidade, a percentagem de spz normais nos cães, normalmente também não é influenciada pela frequência em que são efectuadas as colheitas de sémen. À excepção do aumento do número de spz com gotas citoplasmáticas proximais, que se verifica em cães dos quais se recolha sémen vários dias consecutivos (Root Kustritz, 2007).

As alterações morfológicas dos spz podem ser classificadas segundo o local em que ocorrem (cabeça, acrossoma, peça intermédia ou cauda), podem ser divididas em alterações primárias (aquelas que ocorrem durante a espermatogénese), alterações secundárias (as que ocorrem durante a maturação) e terciárias (as que ocorrem durante a preparação da amostra). Para informação mais detalhada sobre esta classificação, consultar obra de Johnston, et al. (2001). Podem também ser classificadas consoante a influência na capacidade de fertilização, sendo considerados defeitos menores aqueles que não influenciam a fertilidade, e defeitos maiores os que estão correlacionados negativamente com a capacidade de fecundar os óvulos (Johnston et al., 2001). As alterações morfológicas que foram associadas à infertilidade incluem defeitos na ligação da peça intermédia, spz microcefálicos e spz que possuam gotas citoplasmáticas proximais (Feldman & Nelson, 2004). Contudo, há autores que não concordam com esta última nomenclatura, por

considerarem que ainda não há estudos suficientes que relacionem as várias alterações, à capacidade de fecundar os óvulos. Há inclusive autores que preferem identificar as alterações individualmente ao invés de incluí-las em grupos, podendo este tipo de classificação ser vantajoso numa tentativa de identificar defeitos morfológicos que possam ser hereditários (Root Kustritz, 2007).

No processo de avaliação do sémen são registados: o número e tipos de alterações existentes na amostra, e determinada a percentagem de spz normais. Entre as alterações descritas, as que se encontram mais frequentemente são cabeças destacadas, acrossomas salientes ou destacados, gotas citoplasmáticas proximais e distais, peças intermédias ou caudas dobradas, e caudas de ligeira a fortemente enroladas (Feldman & Nelson, 2004). Ter em atenção que quando um espermatozóide apresenta mais que um defeito, deve ser registado o mais grave. Devem-se contar as cabeças destacadas e não as caudas (Freshman, 2002). Quando a colheita se destina a inseminação artificial, as amostras que contenham grande percentagem de spz com gotas citoplasmáticas proximais, caudas dobradas ou enroladas, ou peças intermédias dobradas podem ser usadas no imediato, mas não resistirão à criopreservação (Johnston et al., 2001).

Para alguns investigadores, as amostras de sémen normal devem ter <10% de alterações primárias e <20% de alterações secundárias. O número total de spz normais no ejaculado é calculado multiplicando a percentagem de spz normais pelo número total de spz calculado anteriormente (Feldman & Nelson, 2004; Freshman, 2002).

#### **4.7. Citologia / Cultura microbiana**

Para a realização da citologia deve-se fazer um esfregaço com sémen não diluído, e corar-se com corante de Wright ou com azul de metileno (Feldman & Nelson, 2004). Numa citologia normal encontram-se spz maduros, ocasionalmente glóbulos brancos, bactérias e células epiteliais. Um cão macho fértil pode apresentar até 2000 glóbulos brancos por  $\mu\text{L}$  de ejaculado, ou 2 a 4 glóbulos brancos por campo de visão ao microscópio óptico e, caso os valores encontrados sejam superiores aos referidos, pode ser indicativo da existência de um processo inflamatório patológico (Johnston et al., 2001; Root Kustritz, 2007).

Em cães normais, principalmente após repouso sexual, podem ser encontradas entre 10 a 20 células epiteliais por campo de visão do microscópio (Johnston et al., 2001; Root Kustritz, 2007).

A existência de bactérias intracelulares ou neutrófilos com alterações originadas por toxinas são indicativos de infecção. No entanto, a sua ausência não pode excluir a presença de infecção. Um número elevado de eritrócitos é consequente de hemorragia, normalmente com origem no pénis ou na próstata. Se a contagem de células mononucleares for elevada,

pode ser um indício de orquite imuno-mediada e, nestes casos, podem também ser encontrados neutrófilos em números superiores aos normais (Feldman & Nelson, 2004). A avaliação citológica das secreções prostáticas em busca de células inflamatórias não exclui a cultura microbiana, sendo mesmo recomendado que se faça a todas as amostras de sémen uma cultura para aeróbios, anaeróbios e outra para micoplasma (Johnston et al., 2001). A cultura de sémen pode ser usada para se confirmar infecção dos testículos e epidídimo (nestes casos faz-se a cultura com a segunda fracção do ejaculado) ou da próstata (fazendo-se cultura da terceira fracção) (Feldman & Nelson, 2004). Caso cresçam, em aerobiose, mais de 10.000 unidades formadoras de colónias por mililitro, é sugestivo de infecção do tracto reprodutor (Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001). Não é comum a presença de anaeróbios no sémen de cão, mas caso haja essa suspeita, uma alíquota de sémen deve ser imediatamente inoculada em meio de transporte e enviada para um laboratório (Freshman, 2002). A suspeita da presença de anaeróbios surge nos casos em que há tecidos gangrenosos ou necrosados, ou se forem identificados leucócitos e bactérias na citologia mas as culturas aeróbias tenham sido negativas. A influência do *Mycoplasma* e *Ureaplasma* no tracto reprodutor ainda está por definir, porque apesar de pertencerem à flora normal do prepúcio e uretra distal do cão, já foram isolados em animais com problemas reprodutivos, entre os quais orquiepididimite, balanopostite e infertilidade (Feldman & Nelson, 2004). O sémen não é estéril, daí que os microrganismos comumente isolados pertencem à flora normal da uretra, entre os quais se encontram *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus* sp., *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* sp., *Moraxella* sp., *Pseudomonas* sp., e *Mycoplasma* (Johnston et al., 2001). Para minimizar a contaminação do sémen com esta flora, é aconselhável deixar o cão urinar antes da colheita, remover quaisquer corrimentos prepuciais, e o prepúcio e pénis devem ser limpos com gazes húmidas esterilizadas. Deve-se também desprezar as primeiras gotas da primeira fracção, e todo o material usado na colheita deve estar estéril, assim como a técnica a usar terá de ser o mais asséptica possível (Feldman & Nelson, 2004). É de extrema importância fazer-se o despiste de *Brucella canis* (Johnston et al., 2001). Este agente, além de causador de graves problemas reprodutivos tanto no cão como na cadela, é transmissível venereamente. Muitas vezes a infecção é subclínica, mas pode manifestar-se nos machos provocando infertilidade, orquite, epididimite, atrofia testicular, discospondilite, linfadenopatia generalizada, ou febre de origem desconhecida. Os métodos de diagnóstico de infecções de *Brucella canis* mais frequentemente usados são os testes serológicos (Feldman & Nelson, 2004).

#### 4.8. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é produzida a nível do epidídimo, o que faz desta enzima um excelente marcador biológico. Em amostras de sémen azoospermico, a medição deste parâmetro é essencial para determinar se a causa foi um problema de libido, de produção espermática ou de bloqueio dos ductos deferentes (Feldman & Nelson, 2004; Freshman, 2002).

Os valores da fosfatase alcalina no sémen normal variam entre 5.000 e 40.000 U.I.. Se tiver sido realizada uma colheita e a fosfatase alcalina apresentar valores baixos, é indicativo de bloqueio dos ductos deferentes ou que a colheita foi incompleta. Se a fosfatase alcalina apresentar valores normais, mas o ejaculado for muito translúcido, pode ser resultado de insuficiência testicular ou de obstrução da passagem dos spz entre os testículos e epidídimo (Blendinger, 2007a; Feldman & Nelson, 2004; Martinez, 2004). Investigadores acreditam que a carnitina seminal é originária do epidídimo, podendo funcionar igualmente como marcador em cães azoospermicos. Infelizmente este tipo de análise não está disponível rotineiramente para os veterinários (Feldman & Nelson, 2004).

#### 4.9. Teste de turgescência hipo-osmótico

A integridade da membrana plasmática (em termos morfológicos e também funcionais) tem sido um dos parâmetros mais estudados, dada a sua importância na acção como barreira celular e nas interações célula-célula (Rodriguez-Martinez, 2000). Este teste é considerado, por vários laboratórios, como um método apropriado para avaliar a integridade da membrana e, por ser de realização simples, pode ser incorporado na análise de rotina de sémen (Pinto & Kozink, 2008).

A realização deste teste consiste em misturar a amostra de sémen com um meio hipo-osmótico e incubar a 37 °C durante 45 a 60 minutos. O princípio desta avaliação é que os spz que possuem uma membrana plasmática intacta e funcionalmente activa, vão permitir que o fluido vá circulando para o seu interior, provocando turgescência e enrolamento das caudas dos spz (Root Kustritz, 2007). Num estudo posterior, com o intuito de se reduzir o tempo de incubação para a realização deste teste, compararam-se os resultados de uma amostra de sémen que esteve 60 minutos em contacto com o meio hipo-osmótico, com outra que esteve apenas 1 minuto. Concluiu-se que não haviam diferenças significativas, e ficou demonstrada a facilidade de realização deste teste por qualquer veterinário clínico (Pinto & Kozink, 2008). A solução usada deve ser suficientemente hipo-osmótica para provocar a turgescência celular mas sem causar lise (Bencharif et al., 2010). As soluções hipo-osmolares descritas para uso neste teste incluem o citrato de sódio (7,35g) com frutose (13,51g) em 1000 mL de água destilada, e uma solução de 100mM de sacarose (Root Kustritz, 2007). É citado pelo autor, que a solução que apresenta melhores resultados é a

composta por frutose e citrato de sódio em água destilada, com uma osmolaridade de 100-150 mOsm/kg H<sub>2</sub>O (Bencharif et al., 2010).

O efeito da turgescência é mais facilmente identificável nas caudas dos spz, principalmente por duas razões: quer pela membrana da cauda ser mais flexível e/ou estar menos aderente às estruturas internas do que a membrana da cabeça; quer pelo facto de na cabeça apenas existir um pequeno compartimento para o fluido intracelular, pelo que são dificilmente observáveis aumentos de volume quando há entrada de água na célula (Jeyendran, Van der Ven, Perez-Pelaez, Crabo, & Zaneveld, 1984). É importante que previamente à realização deste teste se contabilize a percentagem de spz com alterações na cauda, para se poder subtrair este valor ao da contagem efectuada após a incubação, obtendo-se assim o verdadeiro valor de spz com a membrana plasmática intacta (Root Kustritz, 2007).

Este teste foi desenvolvido com o intuito de se avaliar de forma rápida a integridade da membrana celular dos spz humanos, tendo sido estabelecido nesse estudo um bom grau de correlação ( $r = 0,90$ ) entre os spz que sofriam turgescência, e a % dos que eram capazes de fertilizar oócitos *in vitro*. Nesse mesmo estudo, as correlações obtidas entre este parâmetro e a % de motilidade progressiva ( $r=0,61$ ), a % de spz morfológicamente normais ( $r=0,3$ ) e a % de spz vivos (entendendo-se estes como os que não coraram com o corante vital) ( $r=0,52$ ), já não foi tão satisfatória (Jeyendran et al., 1984). Até à data, não há conhecimento de alguma relação entre a resposta ao teste hipo-osmótico e a capacidade de fertilização dos spz do cão (Martinez, 2004), contudo já foi demonstrada uma boa correlação entre esta resposta e a motilidade e a viabilidade do esperma canino fresco, e também do descongelado (Pinto & Kozink, 2008).

#### **4.10. Analisador da Qualidade Espermática**

Recentemente, surgiu um novo equipamento de fácil uso, e mais económico que o sistema CASA, designando-se Analisador da Qualidade Espermática. Este aparelho semi-automático detecta variações na densidade óptica, convertendo essa informação num número ao qual se designou “Sperm Motility Index”. Este valor expressa a qualidade da amostra espermática de uma forma geral, tendo em conta a concentração, motilidade progressiva e percentagem de spz com morfologia normal (Rijsselaere et al., 2005). Até à data, ainda não foi descrita nenhuma correlação entre este índice e a fertilidade nos cães.

#### **4.11. Medição de constituintes do líquido seminal**

Dos componentes identificados no líquido seminal do cão, encontram-se produtos glandulares, proteínas e electrólitos (Root Kustritz, 2007). Já foram realizadas análises ao

líquido seminal do cão, com o objectivo de se padronizar valores normais do seu conteúdo mineral, nomeadamente de zinco, ferro, cálcio, magnésio e cobre (Johnston et al., 2001).

A quantidade destes constituintes pode diminuir a valores mínimos após a colheita do sémen, devido ao metabolismo dos spz e à degradação enzimática, como pode ainda ser influenciada pelo intervalo de tempo desde a última ejaculação, nível de excitação sexual, e pelo estado funcional das glândulas sexuais acessórias (Root Kustritz, 2007).

#### **4.12. Filtros, gradientes de centrifugação e coloração fluorescente**

Há vários tipos de filtros descritos para uso na avaliação e na melhoria da qualidade do sémen. Os sistemas de filtração podem ser usados para estimar a funcionalidade dos spz através da avaliação da motilidade, determinando a extensão a que estes conseguem penetrar nos filtros, ou através da retenção dos spz com alterações. No filtrado, a percentagem de spz morfollogicamente normais será superior comparativamente ao sémen antes da filtração, em contrapartida o número total de spz será inferior no sémen filtrado (Root Kustritz, 2007).

A avaliação por gradientes de centrifugação é feita utilizando-se um tubo com meios de várias concentrações em camadas, no topo das quais se coloca uma camada de sémen e depois centrifuga-se. Os spz normais separam-se dos que têm alterações e de outros tipos de células, depositando-se no fundo do tubo. O autor refere que já foi demonstrado noutros estudos, que os spz de cão não sofrem lesões quando sujeitos a uma centrifugação ligeira. Com esta técnica também é possível remover sangue vivo ou hemolisado que esteja presente na amostra (Root Kustritz, 2007).

A coloração fluorescente é outra técnica usada para avaliar características e funções específicas dos spz caninos, tais como: a integridade da membrana plasmática e do acrossoma; o *status* de capacitação e a reacção do acrossoma; a função mitocondrial; as concentrações de cálcio intracelular; a integridade da estrutura da cromatina e conteúdo de ADN; e para determinar proporções de spz vivos e mortos (Martinez, 2004; Rijsselaere et al., 2005). A integridade e funcionalidade da membrana celular dos spz são de extrema importância no processo de fertilização e, como tal, a avaliação destes parâmetros pode ser um indicador útil da capacidade de fertilização dos spz (Jeyendran et al., 1984). Nos últimos anos, várias técnicas de coloração fluorescente têm vindo a ser desenvolvidas. Não se pretende descrever aqui as várias técnicas e corantes existentes, mas apresentar as suas potencialidades. A maior vantagem destas técnicas de coloração é a possibilidade de analisar e categorizar os spz por meio de citometria de fluxo, o que permite a avaliação de grandes quantidades de spz num curto espaço de tempo. Entre outras vantagens está o facto da gordura e outros materiais não corados, como a gema de ovo, não interferirem com este tipo de corantes (ao contrário do que acontece com os corantes convencionais),

permitindo uma avaliação funcional dos spz mais fácil e exacta. Estas técnicas permitem ainda que as diferenças entre as sub-populações espermáticas sejam mais evidentes e consistentes, além de possibilitarem a avaliação simultânea de vários parâmetros funcionais, através da associação de vários corantes (Martinez, 2004; Rijsselaere et al., 2005).

A título de exemplo, o teste da clorotetraciclina permite avaliar a integridade e capacitação do espermatozóide e, sendo este um parâmetro intimamente relacionado com a capacidade de fertilização dos spz, é uma análise já realizada com alguma frequência em avaliações mais exaustivas do sémen. Muito resumidamente, é misturada uma porção da amostra de sémen diluído, com uma solução de tetraciclina e uma solução fixadora. Aplica-se uma gota desta mistura numa lâmina de microscópio, e observa-se sob luz ultra violeta, e avaliam-se cerca de 200 spz sob uma ampliação total de 400x (Iguer-ouada & Verstegen, 2001). Ao entrar na célula, o corante liga-se a iões de cálcio livres. Estes complexos corante-ião de cálcio tornam-se fluorescentes e ligam-se às regiões hidrofóbicas da membrana celular (Martinez, 2004; Rijsselaere et al., 2005). Estão descritos 3 padrões de coloração possíveis nesta técnica: coloração completa do acrossoma, que indica que o acrossoma dos spz está intacto; coloração só do segmento equatorial, indicando que os spz reagiram completamente (perda do acrossoma); e o padrão de coloração pós equatorial, indicando capacitação dos spz (Hewitt, 1999, que é citado por Iguer-ouada & Verstegen, 2001).

Outro exemplo é a coloração com laranja acridina, que permite avaliar a integridade do ADN. É realizado um esfregaço numa lâmina de vidro após misturar este corante à amostra. A visualização no microscópio de fluorescência permite determinar a integridade da cadeia de ADN, consoante as cores apresentadas. Se a coloração fluorescente for verde, significa que o ADN está intacto em cadeia dupla. Se a cor for vermelha houve desnaturação, e o ADN apresenta-se em cadeia simples. A taxa de desnaturação é determinada comparando as proporções de spz que emitem fluorescência vermelha, com a população total de spz (os vermelhos e os verdes). A avaliação do ADN tem grande valor na previsão da fertilidade dos spz, uma vez que nele está contida toda a informação genética, e uma grande % de spz com defeitos no ADN pode traduzir-se em infertilidade, aborto e malformações nos fetos (Bencharif et al., 2010).

#### **4.13. Teste de ligação à zona pelúcida**

A ligação dos spz à zona pelúcida é um passo crucial para que ocorra a fertilização (Strom Holst, Larsson, Linde-Forsberg, & Rodriguez-Martinez, 2000b). Desta forma, pensou-se que se encontrasse algum modo de testar *in vitro* a capacidade dos spz se ligarem à zona pelúcida, se poderia prever o potencial de fertilização dos spz dessa amostra. Pensa-se que este teste detecte lesões nos spz a nível molecular, que por meio das técnicas

convencionais de análise de sémen não são possíveis de visualizar (Rijsselaere et al., 2005).

Esta capacidade de ligação à zona pelúcida já tem sido avaliada por dois tipos de técnicas: uma em que se usam oócitos intactos e outra em que os oócitos são seccionados ao meio. A vantagem desta última técnica é que permite comparar as capacidades de ligação dos spz do macho que se está a testar com os dum macho controlo. A contagem dos spz ligados à zona pelúcida é feita com um microscópio de contraste ou de fluorescência (Rijsselaere et al., 2005).

Já foi demonstrado que esta capacidade de ligação dos spz caninos à zona pelúcida é uma característica específica dos spz vivos (Strom Holst, Larsson, Linde-Forsberg, & Rodriguez-Martinez, 2000a).

#### **4.14. Teste de penetração no oócito e fertilização *in vitro***

Um teste laboratorial mais recente avalia a capacidade dos spz fertilizarem oócitos *in vitro*, uma vez que para a formação pronuclear é necessária a ligação à zona pelúcida, seguida da penetração e descondensação da cabeça do espermatozóide. No entanto, no caso dos cães, a maturação e fertilização dos oócitos *in vitro* é difícil de atingir (Rijsselaere et al., 2005).

Embora alguns dos parâmetros apresentados não possam ser incluídos na análise de rotina duma amostra de sémen, quer pelo custo/disponibilidade dos equipamentos como pela complexidade da técnica, revelam-se de extrema importância em investigação, por exemplo para o desenvolvimento de novos diluidores (ver adiante) ou protocolos de refrigeração/congelamento (Del Valle et al., 2009).

Infelizmente, continua a haver uma escassez de dados relativos a parâmetros de avaliação concretos, quer da capacidade de fertilização dos espermatozoides como da probabilidade de os fetos/cachorros virem a desenvolver-se normalmente (Root Kustritz, 2007).

Para poder classificar o sémen consoante o seu grau de fecundidade, é prioritário o desenvolvimento de estudos que permitam a avaliação da integridade e funcionalidade de diferentes parâmetros espermáticos, que sejam considerados pré-requisitos para a fertilização dado o seu papel na interacção esperma-tracto genital ou esperma-oócito (Rodriguez-Martinez, 2000).

Para que a fertilização se realize com sucesso têm que ocorrer várias reacções e, uma vez que a grande maioria das técnicas laboratoriais usadas avaliam as funções espermáticas isoladamente, é difícil prever com precisão o potencial de fertilidade de determinada amostra de sémen. Desta forma, torna-se lógico que a avaliação conjunta de vários parâmetros



relacionados com a qualidade espermática tenha uma melhor correlação com a fertilidade *in vivo*, do que a avaliação de um só parâmetro (Rota, Strom, & Linde-Forsberg, 1995).

No entanto, o teste derradeiro para avaliar a capacidade de fertilização do sémen canino é ainda o cálculo da taxa de concepção. Porventura este método além de ser demorado, resulta no nascimento de cachorros não desejados. Torna-se assim necessário o desenvolvimento de métodos alternativos para se avaliar a capacidade de fertilização dos spz caninos *in vitro* (Rijsselaere et al., 2005).

## 5. FACTORES QUE INFLUENCIAM A AVALIAÇÃO DO SÉMEN

Os resultados obtidos na avaliação do sémen são influenciados por vários factores externos, nomeadamente a técnica utilizada na colheita, o momento em que esta foi realizada, o tempo decorrido entre a colheita e a análise, a temperatura a que a amostra é mantida, o equipamento e técnicas utilizadas no processamento, entre muitos outros factores (Root Kustritz, 2007). A própria qualidade do sémen é variável consoante o ambiente em que o sémen é colhido, se o macho apresenta alguma afecção do foro reprodutivo ou sistémica, da idade e raça do animal e da época do ano em que a colheita é realizada. Estudos demonstram que cães muito novos, muito velhos ou que nunca tenham reproduzido apresentam sémen de pior qualidade (Johnston et al., 2001; Root Kustritz, 2007). Os primeiros ejaculados de um cão que tenha alcançado recentemente a puberdade contêm grande quantidade de spz com defeitos e mortos. Sempre que haja uma amostra com grande número de spz mortos ou imóveis, antes de se declarar a inaptidão de um cão para reprodutor, deve-se realizar uma segunda colheita e respectiva avaliação, tendo especial cuidado para minimizar defeitos resultantes da manipulação do sémen (Feldman & Nelson, 2004).

As diferenças do ejaculado relacionadas com a raça assentam no número total de spz por ejaculado, factor este que está positivamente correlacionado com a quantidade de massa testicular. Assim, quanto maior o cão, maior a massa testicular, maior produção espermática diária e consequente aumento do número total de spz. Há ainda registos que indicam que cães cruzados têm sémen de melhor qualidade que cães de raça pura (Johnston et al., 2001; Root Kustritz, 2007).

Como já referido anteriormente, a frequência de ejaculações também tem a sua influência, pois há uma diminuição progressiva do volume do ejaculado e do número total de spz até determinado ponto, onde se atinge o *plateau* correspondente à quantidade de produção espermática diária (Feldman & Nelson, 2004).

Quanto à influência que as estações do ano possam ter na qualidade do sémen no momento da sua colheita, vários estudos demonstraram que no hemisfério Norte do globo, o pico da qualidade do sémen era na Primavera/início de Verão e o ponto mais baixo no fim do Verão/Outono, contudo o número total de espermatozóides nunca foi inferior ou superior aos valores limite considerados normais (Johnston et al., 2001; Root Kustritz, 2007). Estas variações podem ser devidas ao fotoperíodo ou por influência da temperatura ambiental (Feldman & Nelson, 2004).

A alimentação pode também influenciar a qualidade espermática dos cães, pois foi testada a suplementação alimentar com ácidos gordos essenciais e vitamina E durante 60 dias consecutivos, tendo-se obtido melhorias da qualidade espermática desses cães. A

metabolização dos ácidos gordos produz ácido araquidónico, que está envolvido na síntese dos mensageiros de AMP cíclico (cAMP), e que por sua vez estão directamente relacionados com a função das células de Leydig. Desta forma, a capacidade de produção de sémen é aumentada, o que eleva a concentração de spz no ejaculado e, associada à acção anti-oxidante da vitamina E, diminui a percentagem de spz anómalos. Os ácidos gordos também contribuem para a fluidez da membrana plasmática e para a flexibilidade da cauda dos spz, contribuindo deste modo para o aumento do vigor da motilidade (da Rocha, da Cunha, Ederli, Albernaz, & Quirino, 2009).

A maioria dos parâmetros avaliados no sémen é subjectiva, daí a importância da sua análise ser feita por técnicos qualificados, com microscópios/equipamento de qualidade, com o método de colheita e com o tipo e sequência de técnicas analíticas adoptadas, metodicamente usadas. Desta forma é possível eliminar, ou pelo menos atenuar, algumas influências nos resultados analíticos por parte do técnico (Rijsselaere et al., 2005).

Independentemente de todos estes factores que influenciam a avaliação do sémen, os espermatozóides examinados *in vitro*, ainda apresentam algumas características diferentes das que terão quando atravessarem o tracto reprodutivo da fêmea após a inseminação, uma vez que ainda não completaram o seu desenvolvimento. Um espermatozóide só terá capacidade para fecundar um óvulo se completar o seu desenvolvimento atravessando várias etapas, isto é, terá que se desenvolver correctamente nos testículos, sofrer a maturação no epidídimo, atravessar o cérvix e útero (auxiliado pelas contracções uterinas), sofrer capacitação e a reacção do acrossoma ao entrar em contacto com o fluido seminal e com as secreções do tracto reprodutor da cadela e, finalmente, penetrar a zona pelúcida do oócito (Root Kustritz, 2007; Witte et al., 2009).

Dos parâmetros que normalmente são avaliados no sémen, os que parecem ter maior correlação com a fertilidade são o número total de spz no ejaculado, a percentagem de motilidade progressiva e a morfologia dos spz. Segundo o autor, para um macho ser considerado apto como reprodutor, a análise do seu sémen deve exceder os critérios mínimos estabelecidos para estes 3 parâmetros. Mas a verdade é que mesmo que isso aconteça, o macho não tem necessariamente que ser fértil (Feldman & Nelson, 2004). Em termos práticos, classificam-se os cães como férteis se apresentarem sémen com características normais, embora não se executem testes de avaliação da capacidade de fecundação desses spz, e cães subférteis os que apresentam um, ou mais parâmetros, com os valores inferiores aos considerados normais. Neste último caso, a classificação dos animais com as técnicas habituais torna-se muito complicada, porque cães que possuíam motilidade progressiva de 10% e apenas com 36 milhões de spz no ejaculado, dos quais somente 9% eram morfologicamente normais, provaram a sua fertilidade com ninhadas nascidas (Johnston et al., 2001). As únicas características que permitem a um veterinário declarar um macho como estéril, são a azoospermia (ausência de spz) ou necropermia

(spz mortos) registadas em várias análises realizadas pelo menos durante 6 meses consecutivos (Feldman & Nelson, 2004).

A standardização e controlo de qualidade entre laboratórios aumentam a precisão das análises e permitem aos investigadores comparar resultados, uma vez que são eliminados alguns factores susceptíveis de influenciar os resultados da avaliação (como as diferentes técnicas e equipamentos usados). A análise ao sémen está sujeita a uma grande quantidade de erros, uma vez que apenas uma pequena proporção de células está a ser avaliada, comparativamente ao número total que existe na amostra. A solução para este problema estaria em avaliar mais células por amostra, mas nesse caso surgiriam outros erros, principalmente relacionados com o cansaço do técnico que estivesse a executar a avaliação. Outros erros casuais que podem ocorrer incluem a perda de parte da amostra aquando da colheita ou durante a análise, amostras mal misturadas, falta de treino adequado por parte do técnico, equipamento mal calibrado ou técnica mal executada (Martinez, 2004; Rijsselaere et al., 2005; Root Kustritz, 2007).

## 6. CONSERVAÇÃO DE SÉMEN

O sémen de cão para ser conservado, pode ser refrigerado a 4 – 5 °C no frigorífico e usado dentro de poucos dias, ou congelado e mantido em azoto líquido indefinidamente. Em qualquer um destes processos tem sempre que se adicionar um diluidor ao sémen colhido, pois além de fornecer nutrientes aos spz, previne o crescimento bacteriano, tem acção crioprotectora e tem um efeito tampão (Johnston et al., 2001).

Apesar da conservação de sémen permitir realizar inseminação artificial (I.A.) e desta forma ultrapassar várias dificuldades, como as já apresentadas anteriormente, a taxa de concepção quando se usa sémen conservado é inferior à do uso de sémen fresco ou da monta natural (Johnston et al., 2001). No caso do uso de sémen congelado, as taxas de concepção são as mais baixas, e rondam os 40% a 60% comparativamente ao sucesso da monta natural. Mas o sucesso para se obter uma ninhada depende da técnica de processamento de sémen utilizada, do número de spz com motilidade, do local de inseminação, do momento correcto da I.A. e do número de inseminações. Há autores que referem que inseminações repetidas com doses moderadas, têm taxas de concepção superiores do que realizar-se apenas uma inseminação com grande quantidade de sémen (Feldman & Nelson, 2004).

Para evitar acções fraudulentas, o American Kennel Club (AKC) já exige que seja feita uma identificação por ADN dos cães aos quais se recolheu sémen para refrigerar ou congelar. A recolha da amostra de ADN é feita pelos próprios donos, com o auxílio de uma zaragatoa da face interna da bochecha do cão (Johnston et al., 2001).

Para qualquer processo de conservação apenas é necessária a segunda fracção do ejaculado, ou seja, a espermática. A selecção da segunda fracção pode ser feita no momento da colheita, em que se despreza as restantes fracções, ou utilizando apenas o sedimento resultante da centrifugação quando todo o ejaculado é colhido (Johnston et al., 2001). Ao contrário do que alguns investigadores pensaram, a diluição do sémen na própria secreção seminal do animal tem efeitos deletérios, havendo mesmo uma diminuição abrupta da motilidade e aumento de alterações do acrossoma logo no primeiro dia de refrigeração (Rota et al., 1995).

Os factores que provavelmente mais afectarão a conservação do sémen são a acumulação de metabolitos ao longo do tempo, com correspondentes alterações do pH e osmolaridade, e a depleção do substrato energético (Verstegen et al., 2005).

## **6.1. Diluidores**

Como já foi referido, o uso de diluidores na conservação do sémen é imprescindível não só para tamponar as alterações do pH, que invariavelmente ocorreriam ao longo do tempo, como são um substrato de energia para os espermatozoides e previnem que nestes ocorram alterações durante a refrigeração, congelação e descongelamento. Podem ainda ter associados agentes bacteriostáticos que evitam o crescimento bacteriano. Alguns diluidores podem ser tanto usados para a preparação do sémen refrigerado como para a do congelado (Shahiduzzaman & Linde-Forsberg, 2007; Verstegen et al., 2005).

### **6.1.1. Soluções tampão**

As soluções tampão são usadas para manter o balanço iónico e o pH do diluidor, sendo o pH óptimo do sémen diluído entre 6,75 e 7,50. Tampões como o Tris (tris-hidroximetil aminometano) ou o potássio na forma de hidróxido de potássio, estão muitas vezes referenciados como parte integrante das soluções usadas como diluidores na conservação de sémen canino (Johnston et al., 2001), removendo os iões de hidrogénio resultantes do metabolismo espermático. Há autores que citam que o Tris tem alguma acção na preservação da energia nos spz, reduzindo a frutólise (A. R. Silva, de Cassia Soares Cardoso, Uchoa, & MacHado da Silva, 2002). O citrato de sódio adicionado à solução age como quelante dos metais pesados existentes no líquido seminal (Johnston et al., 2001).

### **6.1.2. Substratos energéticos**

Os spz dos mamíferos necessitam de fontes energéticas, não só para garantir a concretização das várias necessidades básicas de qualquer célula, como também, e principalmente, para preservar a sua motilidade. Os spz podem obter energia por fosforilação oxidativa mitocondrial ou por glicólise (Ponglowhapan et al., 2004; Volpe et al., 2009). Para fornecimento de energia aos spz recorre-se à adição de glucose, frutose, manose, dextrose ou lactose nos diluidores. O facto do líquido seminal dos cães apresentar concentrações de frutose muito inferiores ao das outras espécies, levou a pensar que a razão seria por os cães não possuírem vesículas seminais. No entanto, sabe-se que os spz dos cães têm capacidade para usar a frutose como fonte de energia (Feldman & Nelson, 2004; Iguer-ouada & Verstegen, 2001; Johnston et al., 2001; Ponglowhapan et al., 2004; Rigau et al., 2001). A glucose e a frutose são, sem dúvida, os recursos energéticos mais frequentemente adicionados aos diluidores para conservação de sémen de cão. E nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados para comparar os efeitos destas duas fontes energéticas em separado, com diferentes concentrações (de 5 mM a 120 mM), ou mesmo associados, e por vezes com resultados contraditórios (Iguer-ouada & Verstegen, 2001; Palomo et al., 2003; Ponglowhapan et al., 2004; Rigau et al., 2001; Rigau et al., 2002). Num estudo em que se comparou o efeito de vários diluidores na motilidade de sémen

refrigerado (avaliada de forma objectiva com um CASA), os spz que se encontravam num meio com glucose preservaram melhor a motilidade dos que estavam num meio com frutose. Os autores presumiram que possivelmente, haveria uma preferência dos spz caninos para metabolizarem a glucose em detrimento da frutose (Iguer-ouada & Verstegen, 2001). Mas em outro estudo, o diluidor com 70mM de frutose, permitiu melhor conservação das características relacionadas com a motilidade, comparativamente a um diluidor com a mesma concentração de glucose (Ponglowhapan et al., 2004). Outros estudos realizados, evidenciaram que os spz caninos metabolizam a glucose e a frutose usando vias separadas, resultando em variações no metabolismo da hexose (Rigau et al., 2002), na deposição de glicogénio (Palomo et al., 2003) e até nos padrões de motilidade (Rigau et al., 2001). Neste último estudo, demonstrou-se que spz incubados num meio enriquecido com frutose apresentam um padrão de motilidade mais rápido e linear, comparativamente aos incubados em glucose, que por sua vez apresentaram um padrão de motilidade muito semelhante ao manifestado pelos spz hiperactivados (ver mais à frente). O facto da glucose apresentar um papel preponderante na hiperactivação dos spz em várias espécies, e do líquido seminal do cão não conter os monossacarídeos mais comuns, leva a pensar que existam zonas específicas no tracto reprodutor da cadela que produzem diferentes monossacarídeos com o intuito de induzir determinado padrão de motilidade espermático (Rigau et al., 2001).

Quando se conserva sémen, nas primeiras 24 horas de armazenamento há um consumo elevado da fonte energética (devido à grande actividade dos gâmetas durante este período), registando-se uma diminuição razoável da sua concentração no diluidor até a amostra atingir os 4°C, em que há uma diminuição do metabolismo e das reacções químicas e, consequentemente da motilidade dos spz (Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005).

### **6.1.3. Crioprotectores e estabilizadores de membrana**

A gema de ovo, proteínas do leite e albumina sérica de bovino são substâncias usadas para conferir protecção aos spz durante a refrigeração, congelação e descongelação, tendo também alguma influência no controlo do pH (Feldman & Nelson, 2004). A gema de ovo ainda previne a perda ou substitui fosfolípidos da membrana dos spz (A. R. Silva et al., 2002; Verstegen et al., 2005), confere protecção contra alterações da pressão osmótica (Witte et al., 2009) e tem definitivamente um papel protector contra a reacção espontânea do acrossoma, embora não se saiba ainda o mecanismo concreto que ocorre (Iguer-ouada & Verstegen, 2001). No entanto, há autores que põem a hipótese desta acção protectora ser derivada de uma interacção específica entre lipoproteínas de baixa densidade (LDL) do ovo, com algumas proteínas maiores do líquido seminal (Bencharif et al., 2010; Manjunath, Nauc, Bergeron, & Menard, 2002). Deste modo é diminuída a perda de colesterol e fosfolípidos da

membrana dos spz, prevenindo a capacitação prematura e subsequente reacção do acrossoma (Bergeron et al., 2004).

Para crioprotecção, os componentes mais comumente usados nos diluidores de sémen de cão são a gema de ovo e o glicerol (Johnston et al., 2001). A constituição da gema de ovo ainda não está bem definida, sabendo-se que é uma entidade biológica bastante complexa que contém lípidos, fosfolípidos, proteínas, glucose, vitaminas e antioxidantes como a vitamina C e E (Huopalathi et al. são citados por Farstad, 2008). Estes antioxidantes têm um papel importantíssimo na prevenção de lesões oxidativas celulares causadas por moléculas reactivas de oxigénio (ver mais à frente) (Farstad, 2008), que são produzidas pelos spz e pelos leucócitos infiltrados no sémen (Michael et al., 2009). A lecitina e cefalina são fosfolípidos presentes na gema de ovo, com elevado peso molecular, que não entram dentro dos spz e sendo higroscópicos vão fazer com que a água das células passe por osmose para o espaço extracelular, criando desta forma espaço para o líquido congelar sem causar danos aos spz (Farstad, 2008).

A gema de ovo é actualmente considerada uma matéria biológica de risco, devido à recente dispersão de doenças zoonóticas das aves, com ênfase para a gripe aviária, tornando extremamente difícil o transporte de sémen diluído em gema de ovo, e em alguns países foi mesmo proibida a sua importação ou exportação (Abe et al., 2008; Farstad, 2008). Actualmente a maioria, se não todos, os diluidores para congelação de sémen de cão disponíveis comercialmente requerem a adição de gema de ovo (Farstad, 2008). Como alternativa, tem vindo a implementar-se cada vez mais o uso de leite desnatado nos diluidores, com resultados muito semelhantes aos de gema de ovo (Abe et al., 2008).

No entanto, o maior problema dos diluidores à base de gema de ovo, e também nos de leite, é que estes produtos biológicos têm uma composição complexa e, além disso, podem diferir entre lotes tornando ainda mais difícil a standardização de diluidores à base destas substâncias (Beccaglia M., Anastasi P., Chigioni S., & G.C., 2008; Pagl, Aurich, Muller-Schlosser, Kankofer, & Aurich, 2006). Este problema tem estimulado a realização de vários estudos em busca de substâncias quimicamente definidas, que venham a substituir a utilização de substâncias complexas na conservação de sémen (Bencharif et al., 2008; Del Valle et al., 2009; Farstad, 2008; Pagl et al., 2006). Com o recurso ao fraccionamento do leite, já foi possível preparar diluidores com fracções de proteína purificada, sendo o fosfocaseinato e a  $\beta$ -lactoglobulina as mais eficazes na conservação de sémen refrigerado, não se verificando diminuição na qualidade do sémen comparativamente ao uso de outros diluidores à base de leite (Pagl et al., 2006).

Lipoproteínas de baixa densidade extraídas da gema de ovo, a uma concentração de 6% nos diluidores, têm apresentado melhores resultados. Conferiram melhor protecção do ADN durante a congelação e melhoraram a sobrevivência dos spz mesmo após descongelação, comparativamente a diluidores com gema de ovo completa, ou a diluidores comerciais



(Bencharif et al., 2008). Outra vantagem destes diluidores com substâncias purificadas, é que diminuem muito os artefactos nas amostras durante a avaliação do sémen, mesmo quando se recorre a sistemas CASA. Isto porque os diluidores com 20% de gema de ovo, por exemplo, apresentam muitos grânulos e interferem muitas vezes com as leituras destes aparelhos, já para não falar das interferências nas colorações de lâminas nos métodos mais tradicionais (Bencharif et al., 2010).

Outros constituintes que podem ser usados nos diluidores, para protecção dos spz da diminuição da temperatura, são a albumina sérica de bovino, a ribose e a arabinose (Feldman & Nelson, 2004).

Alguns autores defendem que os efeitos protectores dos lípidos nos diluidores se devem mais a uma associação destes com a membrana celular, do que propriamente a modificação e reorganização da membrana. Com isto, os lípidos podem vir a ser um novo grupo com perspectiva a substituir a utilização da gema de ovo como base nos diluidores de sémen (Farstad & Waterhouse, 2006).

Outra possibilidade, como a lecitina vegetal (extraída da soja), está a ser actualmente estudada numa tentativa de se evitar o uso de produtos com origem animal, uma vez que estes apresentam um risco de potencial contaminação microbiana (Beccaglia M. et al., 2008; Farstad, 2008), já se tendo obtido bons resultados com este produto na criopreservação de sémen de bovino (Aires et al., 2003) e na refrigeração de sémen canino (Beccaglia M. et al., 2008). Outros estudos têm procurado outras alternativas, sendo a água de coco uma das possibilidades (de Cassia Soares Cardoso, Silva, & da Silva, 2006).

O glicerol por sua vez tem um peso molecular pequeno e, dessa forma, consegue entrar nos spz e ligar-se à água intracelular, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares e levando a uma desidratação celular lenta (Johnston et al., 2001; A. R. Silva et al., 2002). Há autores que ponderam a hipótese do glicerol induzir alterações na estrutura membranal lipídica dos spz, e assim alterar a estabilidade e permeabilidade da célula à água (Farstad, 2008). No sémen ao qual foi adicionado o glicerol, regista-se uma diminuição da percentagem de spz com motilidade progressiva e, quanto maior a proporção de glicerol no diluidor maior será a diminuição dessa percentagem, verificando-se que em crescentes concentrações de glicerol os spz com acrossoma intacto são cada vez menos. Desta forma, foi identificada uma acção tóxica do glicerol nos spz, sendo importante o uso de uma concentração adequada que equilibre os efeitos protectores e os tóxicos (Curry, 2000; Holt, 2000). Os melhores resultados em relação á percentagem de spz com motilidade progressiva em sémen de cão descongelado, estão associados ao uso de diluidores com 2 a 5% de glicerol (Schafer-Somi, Kluger, Knapp, Klein, & Aurich, 2006).

#### 6.1.4. Anti-oxidantes

A suplementação dos diluidores com antioxidantes pode reduzir o impacto do stress oxidativo durante o processo de conservação do sêmen, melhorando a qualidade do sêmen refrigerado. Os spz são altamente susceptíveis ao stress oxidativo e particularmente à peroxidação lipídica, dado as suas membranas plasmáticas possuírem um alto teor em ácidos gordos polinsaturados (Beccaglia M. et al., 2008; Michael et al., 2009; Monteiro et al., 2009).

Os ácidos gordos são por si só essenciais para a funcionalidade dos spz, mas assumem um papel de maior importância pelo facto dos spz serem incapazes de ressintetizar os constituintes das suas membranas (Henkel, 2005; Monteiro et al., 2009). As moléculas reactivas de oxigénio (normalmente designadas por ROS – “reactive oxygen species”) produzidas no ejaculado podem induzir directamente a peroxidação lipídica, alterar a estrutura do acrossoma inibindo a ligação do espermatozóide ao oócito e causar imobilidade irreversível nos spz. Além disso, provocam alterações nas reacções metabólicas, danificam proteínas e ácido nucleico que podem conduzir à apoptose e morte celular. Indirectamente também podem provocar stress oxidativo, diminuindo as defesas enzimáticas dos spz (desempenhadas pela catalase e pela superóxido dismutase) (Beccaglia M. et al., 2008; Michael et al., 2009; Monteiro et al., 2009).

Por outro lado, pequenas quantidades de moléculas reactivas de oxigénio são necessárias para os spz adquirirem capacidades de fertilização, pois além de estarem envolvidas com as funções de motilidade destas células, também participam nos processos de capacitação e reacção do acrossoma, estimulando a produção de cAMP intracelular. Deste modo, pode dizer-se que as moléculas reactivas de oxigénio em pequenas concentrações funcionam como mediadores das funções normais dos spz, mas quando em excesso têm uma acção altamente tóxica sobre as células (Michael et al., 2009), danificando as membranas celulares e o próprio ADN (Farstad, 2008).

Já foram identificadas substâncias anti-oxidantes no líquido seminal e nos próprios spz, como o glutatião e o ácido ascórbico (Monteiro et al., 2009), mas como durante a manipulação e conservação do sêmen os spz estão expostos a uma concentração de oxigénio superior, comparativamente às suas condições fisiológicas normais, a adição de anti-oxidantes aos diluidores assume a sua relevância (Beccaglia M. et al., 2008).

Com a adição de anti-oxidantes, como o ácido ascórbico e o piruvato aos diluidores de sêmen, têm-se observado aumentos na percentagem de spz móveis e viáveis (Eulenberger, Schafer-Somi, & Aurich, 2009; Pagl et al., 2006). Noutro estudo, diluidores aos quais foram adicionados taurina, catalase, vitamina E, N-acetil-L-cisteína ou ácido 5-(4-dimetilaminofenil)-2-fenil-penta-2,4-dienóico (B16), demonstraram todos eles melhores resultados do que os mesmos diluidores sem antioxidantes, ao fim de 72h de refrigeração (Michael et al., 2009). No entanto, as doses, tipos e combinações de anti-oxidantes que

podem ser usados em diferentes técnicas de processamento de sémen, são ainda controversas e exigem que se realizem mais estudos nesta área (Beccaglia M. et al., 2008).

#### **6.1.5. Protectores de membrana**

A adição de substâncias detergentes como o dodecil sulfato de sódio, associado à gema de ovo, parece aumentar a longevidade dos spz após descongelação (Farstad, 2008), uma vez que aumenta a permeabilidade da membrana e assim reduz o choque osmótico. Esta substância está também comercialmente disponível, já incluída num produto designado de Equex STM Paste®. Este “ingrediente”, que é solúvel em água, pode ser adicionado aos diluidores com o objectivo de conferir boa fertilidade aos spz, mesmo após a descongelação do sémen (Bencharif et al., 2010). Contudo, é de salientar que num estudo em que também se testou esta substância para a conservação de sémen a 5º C, os resultados não foram os esperados, pois registou-se uma diminuição da motilidade espermática. A percentagem de spz com mobilidade foi satisfatória só durante 3 dias, enquanto na amostra sem esta substância manteve valores satisfatórios por 7 dias. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que a adição Equex STM® provocou alterações na motilidade, semelhantes às apresentadas pelos spz hiperactivados, e diminuiu o tempo de vida dos spz em refrigeração (Nizanski, Klimowicz, Partyka, Savic, & Dubiel, 2009).

#### **6.1.6. Antibióticos**

Para inibir o crescimento bacteriano no sémen, é frequentemente adicionado ao diluidor antibióticos. A associação mais frequentemente usada é de sódio-benzilpenicilina (ou potássio penicilina G) e sulfato de dihidroestreptomicina (Abe et al., 2008; Beccaglia M. et al., 2008; Ponglowhapan et al., 2006). A gentamicina é outro antibiótico que se pode adicionar aos diluidores (Johnston et al., 2001).

O tipo de antibiótico adicionado ao diluidor pode ter influência sobre a motilidade espermática, já tendo sido demonstrado que a gentamicina acima de uma determinada concentração, diminui a motilidade (Aurich & Spergser, 2007).

#### **6.1.7. Proporções de diluição**

A diluição do sémen de cão nos diluidores pode ser feito quer em proporções de volume definidas (ex.: uma parte de sémen para três de diluidor), quer determinando a concentração inicial de spz e misturar o sémen com o diluidor até perfazer uma concentração de spz pretendida. Este último método providencia um meio melhor para os spz, uma vez que a quantidade do diluidor adicionada não é arbitrária e está dependente do volume de sémen

ao qual vai ser adicionado, permitindo o cálculo exacto das percentagens de tampão e de crioprotectores que serão necessários. Diluições demasiado elevadas, por exemplo uma parte de sémen para 16 ou 32 partes de diluidor, causam uma diminuição significativa na percentagem de spz com motilidade progressiva (Johnston et al., 2001). É recomendado que se misturem previamente apenas algumas gotas de sémen a um pequeno volume de diluidor, para avaliar os efeitos deletérios na viabilidade dos spz, antes de toda a amostra ser diluída e ficar inviabilizada (Feldman & Nelson, 2004).

#### **6.1.8. Exemplos de diluidores**

Os diluidores depois de preparados podem ser congelados em alíquotas com uma validade de cerca de 1 ano. Os diluidores específicos pré-preparados para sémen de cão comercialmente disponíveis têm uma composição desconhecida (Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001).

Diferentes diluidores têm sido usados mas o diluidor perfeito ainda não foi encontrado. Para comparar a eficácia dos vários diluidores, o ideal seria testar as suas taxas de concepção *in vivo*. No entanto sobrepõem-se os problemas já apresentados anteriormente (L. D. Silva & Verstegen, 1995).

Embora nos cães se obtenham boas taxas de fertilidade com o recurso ao sémen refrigerado, a melhoria do processamento do sémen diluído permitiria reduzir as doses de inseminação necessárias, que a maioria dos investigadores acreditam que deveria ser entre 150 e 200 x 10<sup>6</sup> spz/inseminação (Michael et al., 2009).

**Tabela 1 - Exemplos de alguns diluidores para refrigeração**

Ref. Bibliográfica	Diluidor	Composição
(Iguer-ouada & Verstegen, 2001)	Tris-frutose	Tris (hidroximetil)-aminometano (3,025 g), citrato de sódio monohidratado (1,7 g), frutose (1,25 g), benzilpenicilina (100 mg), sulfato de dihidroestreptomicina (100 mg), 20 % de volume de gema de ovo e água destilada (100 mL)
	Tris-glucose	igual ao anterior, com a substituição da frutose por glucose (1,25 g)
	Tris-BES	Tris (0,43 g), BES ácido (N,N-bis (2-hidroxietil)-2-aminoetanossulfônico (1,49 g), lactose (3,4 g), glucose (0,59 g), benzilpenicilina (100 mg), sulfato de dihidroestreptomicina (100 mg), 20 % de volume de gema de ovo e água destilada (100 mL)
	EDTA	glucose (6 g), EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (0,37 g), bicarbonato de sódio (0,12 g), benzilpenicilina (100 mg), sulfato de dihidroestreptomicina (100 mg), 20% de volume de gema de ovo e água destilada (100 mL)
(Abe et al., 2008)	Leite desnatado	30 mg/mL de leite desnatado e glucose (0,3 M) são dissolvidos em meio de transferência de embriões, depois a solução é centrifugada e é usado o sobrenadante depois de filtrado
(Rota et al., 1995)	Gema de ovo e leite	leite pasteurizado com 0,1% de gordura, benzilpenicilina (1 mg/mL), sulfato de dihidroestreptomicina (1 mg/mL), 20 % de volume de gema de ovo
	Gema de ovo e nata	natas ultra-pasteurizadas com 12% de gordura, benzilpenicilina (1 mg/mL), sulfato de dihidroestreptomicina (1 mg/mL), 20 % de volume de gema de ovo
(de Cassia Soares Cardoso et al., 2006)	Água de coco	água de coco depois de filtrada 2 vezes através de papel de filtro (50% v/v), 25% de água destilada e 25% de uma solução a 5% de citrato monossódico anidro

## 6.2. Refrigeração de sémen

A primeira inseminação artificial realizada com sucesso na espécie canina, recorrendo-se ao uso de sémen refrigerado, foi feita em 1954 e descrita por Harp AE. Mas desde essa data houve uma grande evolução nesta área (Verstegen et al., 2005).

Actualmente, a maioria dos diluidores usados para a refrigeração de sémen de cão contém gema de ovo. Contudo, por muito bom que o diluidor seja, com o decorrer do tempo verifica-se sempre uma diminuição progressiva da percentagem de spz móveis, quando preservados por refrigeração a uma temperatura entre os 4 e 5°C. É de salientar que este decréscimo não é tão acentuado quando se usam diluidores com 20% de gema de ovo,

comparativamente a quando se usa apenas 5 ou 10%, ou quando se usam diluidores à base de leite desnatado. A percentagem de spz com motilidade progressiva, analisada em amostra aquecida, diminui na ordem dos 50% por cada 4,9  $\pm$  1 dias desde a diluição e refrigeração da amostra (Johnston et al., 2001). Nos vários estudos já realizados sobre a refrigeração de sémen de cão, a motilidade foi muitas vezes considerado um indicador da viabilidade dos spz e, como tal, era o pãmetro de referência na avaliação da amostra de sémen. Na maioria desses estudos, a motilidade da amostra foi avaliada durante 4 dias e os resultados obtidos no 4º dia variaram de 4 a 80%. Esta variação tão ampla pode ser devida a vários factores, incluindo: diferenças da motilidade da amostra inicial (antes de qualquer processamento); diferenças na composição dos diluidores; diferenças nos métodos de avaliação da motilidade (se objectivos ou subjectivos); e diferenças nos procedimentos de conservação, tais como taxa de arrefecimento, concentração espermática, remoção ou não do fluido prostático (Ponglowhapan et al., 2004).

A importância da inclusão da gema de ovo nos diluidores já foi provada com a sua adição a diferentes diluidores comercialmente disponíveis, e que mostrou preservar melhor vários parâmetros de motilidade dos spz, comparativamente ao uso dos diluidores na forma como são vendidos (Iguer-ouada & Verstegen, 2001).

No caso dos diluidores à base de leite desnatado, este tem que ser aquecido a 92º-95ºC durante 10 minutos de modo a desnaturar as proteínas do leite (Johnston et al., 2001). Quando preparado com os devidos cuidados, o sémen de cão diluído e refrigerado, facilmente se mantém viável durante 24 horas e, dependendo da técnica usada, pode permanecer viável durante 5 dias (Feldman & Nelson, 2004). Vários estudos têm sido desenvolvidos nesta área ultimamente, e novos limites se têm atingido. Em outros estudos, foi registada uma boa vitalidade dos spz, com potencial de fertilização, ao fim de 13 dias de refrigeração com um diluidor Tris-glucose (Iguer-ouada & Verstegen, 2001; Shahiduzzaman & Linde-Forsberg, 2007). E mais recentemente, um estudo com uma metodologia inovadora em que se centrifuga o sémen diluído, remove-se o sobrenadante e adiciona-se diluidor fresco, permitiu chegar-se a conclusões interessantes: reforçou a importância da adição de substratos energéticos aos diluidores; demonstrou que trocas dos meios durante a refrigeração permitem prolongar a vitalidade do sémen, chegando mesmo a haver uma % razoável de spz com motilidade ao fim de 20 dias; e conseguiu-se conservar o potencial de fertilidade dos spz, pelo menos durante os primeiros 9  $\pm$  1,8 dias de armazenamento, testada *in vivo* (Verstegen et al., 2005). Surgem assim novos estudos apresentando composições de diluidores que, juntamente com um armazenamento à temperatura adequada, permitem ultrapassar uma desvantagem da conservação de sémen por refrigeração, que é a curta-duração de viabilidade. Estes estudos revelam assim a presença de motilidade espermática durante aproximadamente 3 semanas de conservação a 4ºC, superando em muito o prazo de utilização do sémen de 48h pós-colheita, quando era

preservado no próprio líquido seminal, ou de 4 dias recomendado pela grande maioria dos estudos desenvolvidos com outros diluidores (Ponglowhapan et al., 2004; Verstegen et al., 2005).

Também foi demonstrada a importância do tipo de contentor que se usa para armazenar/transportar o sémen, pois tem influência na sua qualidade final. O Equitainer® (reservatório normalmente utilizado para transporte de sémen de cavalo) apresentou melhores resultados ao fim de 72 horas do que a caixa de esferovite ou a garrafa isotérmica. O Equitainer® tem uma taxa de refrigeração controlada de  $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e mantém uma temperatura final de  $4-6^{\circ}\text{C}$  por mais de 70h a uma temperatura ambiente de  $22^{\circ}\text{C}$  (G. Lopes, Simoes, Ferreira, Martins-Bessa, & Rocha, 2009).

Apesar de todo o desenvolvimento nesta área, continuam a haver cães cujo sémen não tolera os processos de diluição e refrigeração. Para evitar gastos desnecessários, recomenda-se que previamente à colheita definitiva do sémen que se pretende enviar para inseminar, se proceda a uma colheita para realização de testes, diluindo-se o sémen colhido e colocando-o num frigorífico durante 24 horas, findas quais se avalia a motilidade dos spz após aquecimento da amostra (a luz do microscópio é suficiente para aquecer a gota de amostra que é colocada na lâmina). Caso não se verifique sinais de motilidade após alguns minutos, a probabilidade desse sémen ter capacidade de dar origem a uma ninhada torna-se muito baixa (Johnston et al., 2001).

Este processo de conservação de sémen de curta duração permite que o sémen seja transportado de véspera por avião para o destino pretendido, sem os custos do processamento e as complicações de transporte do sémen congelado (Iguer-ouada & Verstegen, 2001; Ponglowhapan et al., 2004). O sémen deve ser enviado em tubos plásticos estéreis para não se quebrarem, e devem seguir acondicionados em recipientes isotérmicos ou em caixas de esferovite com placas de gelo. É imperativo que a temperatura não desça abaixo dos  $0^{\circ}\text{C}$  para a amostra não congelar, por isso deve-se envolver os tubos num pedaço de algodão, de modo a evitar o contacto directo entre os tubos com sémen e as placas de gelo. Como estes recipientes são leves e também não precisam de ser devolvidos, tornam este modo de transporte bastante económico (Blendinger, 2007b). Antes de se proceder à inseminação, o sémen deve ser aquecido em banho-maria, lentamente, até atingir os  $37^{\circ}\text{C}$  (Feldman & Nelson, 2004).

Durante a conservação no frio, já foram registadas alterações semelhantes às que ocorrem na capacitação dos spz, indicando que apesar das baixas temperaturas a capacitação dos spz continua a ocorrer, diminuindo a sua longevidade e comprometendo a sua capacidade de fertilização. Neste caso, identificam-se os spz capacitados recorrendo-se à fluorescência (como a técnica da clorotetraciclina), juntamente com a análise das características da motilidade associadas à capacitação (Del Valle et al., 2009; Martinez, 2004; Ponglowhapan et al., 2004; Witte et al., 2009). Uma vez que a progesterona, o colesterol e o cálcio são

fundamentais para que a capacitação e reacção do acrossoma ocorram, e todas estas substâncias estão presentes na gema de ovo, fez-se um estudo para certificar se a presença da gema de ovo nos diluidores seria a responsável por estas reacções ocorrerem mesmo a temperaturas de refrigeração. Concluiu-se que nos diluidores normalmente utilizados (20% de gema de ovo), as quantidades presentes destas substâncias não afectam a viabilidade, longevidade ou a percentagem de spz com acrossoma reagido, durante 4 dias em refrigeração. Até pelo contrário, confirmou-se que os diluidores que possuem gema de ovo têm efectivamente uma acção estabilizadora nos spz, prevenindo o aumento significativo de spz capacitados (Witte et al., 2009).

No entanto, com o registo destas alterações, há autores que defendem que para uma inseminação artificial decorrer com sucesso é necessário que esta seja efectuada no período de maior fertilidade da cadela, isto é, 2 a 5 dias após ovulação, e que se realize via intra-uterina em detrimento da via intra-vaginal (Ponglowhapan et al., 2004).

Estudos recentes demonstraram ser possível congelar sémen já previamente refrigerado, sem uma deterioração significativa dos spz. Isto permite que a colheita do sémen seja feita perto da residência do animal e que o sémen seja enviado (já refrigerado) para um centro de criopreservação, poupando desta forma dinheiro e tempo aos donos dos animais (Hermansson & Linde Forsberg, 2006; Ponglowhapan et al., 2006).

### **6.3. Congelação de sémen**

A preservação de sémen de longa duração, com recurso à congelação, já é utilizada há alguns anos, tendo sido descrita a primeira inseminação artificial realizada com sucesso em cães, com sémen congelado, por Seager em 1969. Desde então muitos estudos e testes de técnicas e diluidores têm sido feitos (Iguer-ouada & Verstegen, 2001). O AKC aprova o registo de ninhadas resultantes de inseminação artificial com uso de sémen congelado desde 1981 (Feldman & Nelson, 2004)

Há muitas variáveis que afectam o sucesso da utilização de sémen canino congelado, entre as quais a qualidade do sémen usado (que deve ser excelente), as cadelas devem estar em idade de reproduzir e não terem historial de infertilidade ou de doenças do tracto reprodutor (Johnston et al., 2001). Há ainda variabilidades individuais, além das inter-espécies, quanto à capacidade de resistência do sémen à congelação (Farstad & Waterhouse, 2006; Schafer-Somi et al., 2006). Já foi desenvolvido um teste com o intuito de prever se uma amostra de sémen de cão pode ser criopreservada com sucesso, recorrendo ao uso de cálcio ionóforo para provocar artificialmente a reacção do acrossoma (Szasz et al., 2000).

A congelação de sémen de cão e sua utilização em inseminação artificial, ainda não ocorre tão frequentemente como nos equinos e bovinos. Isto pode dever-se a vários factores, entre os quais o incómodo e custo de transporte do macho até às instalações de processamento e



congelamento de sêmen, os custos da própria congelamento e armazenamento do sêmen, assim com as baixas taxas de concepção atingidas na inseminação artificial com sêmen congelado nos cães (Feldman & Nelson, 2004).

A percentagem da motilidade progressiva dos spz diminui significativamente com a congelamento e descongelamento, pois inevitavelmente ocorrem lesões funcionais e/ou morfológicas devido ao stress osmótico, químico e mecânico causados pelos procedimentos de criopreservação. Estes procedimentos não causam só a morte a alguns spz, como provocam lesões latentes na população dos spz que sobrevive à criopreservação, e que acabam por comprometer as suas longevidade e capacidade de fertilização (Martinez, 2004). Alguns autores referem que foram identificadas alterações nos spz após criopreservação, do tipo das que caracterizam a apoptose celular, apontando o processo de refrigeração como causa destas alterações (Del Valle et al., 2009; Ortega-Ferrusola et al., 2008). Durante a apoptose celular acredita-se que ocorram lesões a nível mitocondrial, fragmentação do ADN e translocação da fosfatidilserina (Del Valle et al., 2009).

Com todas estas alterações a ocorrer, amostras que inicialmente eram pobres podem ficar inutilizáveis após descongelamento. Desta forma, só amostras de boa qualidade, com um número total de spz adequado e uma percentagem de motilidade progressiva superior a 70%, podem ser consideradas aptas para crioconservação. O sêmen pode ter que ser colhido várias vezes de modo a garantir um determinado número de doses de inseminação (Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001). O número de doses de sêmen para inseminação que se pode obter de um único ejaculado depende muito da qualidade deste, podendo variar de uma a 20 doses. Por outro lado, o número de doses que é necessário usar numa inseminação, para garantir a concepção, varia consoante a quantidade de spz viáveis existentes por dose e da técnica usada na inseminação, pois a inseminação intra-uterina requer menor quantidade de spz por dose do que a inseminação vaginal (Feldman & Nelson, 2004).

Após a colheita o sêmen é centrifugado e a fracção espermática diluída num meio próprio para criopreservação. De seguida é feito um arrefecimento ao sêmen diluído, previamente à congelamento propriamente dita, de modo a reduzir as lesões resultantes da descida abrupta da temperatura. Este tempo de refrigeração óptimo ainda não foi definido, mas experiências realizadas com o sêmen a 4º - 5ºC durante 1, 2 ou 3 horas não resultou em qualidade diferente do sêmen após descongelamento, utilizando-se normalmente apenas 1 hora. Depois adicionam-se mais duas partes de diluidor, à temperatura de refrigeração, de modo a que a concentração final de glicerol seja de 4% (Johnston et al., 2001).

O sêmen pode ser congelado em ampolas de vidro, palhinhas ou sob a forma de pellet. Os pellets são formados quando o sêmen refrigerado é depositado em alíquotas de 50 a 100 µl em depressões de gelo seco, e depois armazenados em eppendorfs em azoto líquido. No caso das palhinhas de cloreto de polivinil (PVC), existem em volumes de 0,25 ou 0,50 mL, e

são preenchidas com o sémen refrigerado. Cobre-se uma das extremidades com algodão (deixando sempre uma bolha de ar entre o sémen e o algodão), e a outra extremidade com polivinilpirrolidona, sendo a amostra refrigerada mais uma hora e meia pelo menos. Entretanto prepara-se uma caixa de esferovite, cobrindo-se o fundo com azoto líquido até uma altura de 10 cm e aguarda-se. Colocam-se depois os reservatórios com o sémen numa prateleira a 5 cm acima da superfície do líquido durante 6 minutos e, só depois, são mergulhados pelo menos durante 5 minutos, findos quais se transferem para o tanque permanente ou de transporte. No fim do processo, dada a variabilidade individual do sémen em relação à capacidade de resistir à congelação, pode descongelar-se uma das palhinhas para se avaliar a qualidade do sémen pós congelação, evitando-se gastos desnecessários no transporte caso a amostra de sémen se tenha deteriorado. A qualidade do sémen descongelado pode também variar consoante se foi conservado em palhinhas ou eppendorfes, e dependendo do diluidor utilizado (Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001).

Para o transporte de sémen congelado ser efectuado é imprescindível o uso de um contentor de azoto líquido, o qual tem a capacidade para manter a temperatura a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Os contentores actualmente usados designam-se de secos, pois têm um material poroso nas suas paredes que absorve o azoto líquido. O preço deste equipamento e o seu próprio transporte são factores que tornam esta modalidade mais dispendiosa que o transporte de sémen refrigerado (Blendinger, 2007b).

A taxa óptima de congelação do sémen de cão está dependente do diluidor e do crioprotector usados, assim como do volume da amostra. Se a congelação se processar a uma velocidade desadequada, os cristais de gelo que se formam intracelularmente vão levar à ruptura dos spz (Johnston et al., 2001). Se a amostra congelar demasiado lentamente ( $-0,5$  a  $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), forma-se um gradiente osmótico com a subsequente desidratação e crenação das células. A congelação demasiado rápido ( $-50$  a  $-99^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) também se mostrou prejudicial para o sémen de cão. Os valores reportados para a taxa de congelação que até à data mostraram melhores resultados, foram o da congelação directa do sémen até aos  $-80^{\circ}\text{C}$  ( $-17^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), seguida de uma rápida descida da temperatura até aos  $-130^{\circ}\text{C}$  ( $-7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) (Schafer-Somi et al., 2006).

A taxa de descongelação é tão importante para a sobrevivência dos spz do cão como a taxa de congelação. Se a taxa de descongelação for muito lenta, os cristais de gelo podem recrystalizar e formar cristais de maiores dimensões, provocando lesões nos spz (Hermansson & Linde Forsberg, 2006). O processo de descongelação mais usado para o sémen de cão é imergir as amostras em banho-maria a  $75^{\circ}\text{C}$  durante 6 segundos, e depois imergir em água a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos (se em palhinhas de 0,25mL) ou 60 segundos (se em palhinhas de 0,50mL ou pellets) (Johnston et al., 2001).

Como já foi citado anteriormente, apesar de não ser o melhor indicador, a percentagem da motilidade progressiva continua a ser o parâmetro mais tido em conta na avaliação da qualidade de sémen descongelado, e normalmente pode ocorrer uma redução de cerca de 50 a 60% comparativamente aos valores registados antes da congelação. A adição de pentoxifilina ao meio de descongelação aumenta a percentagem de spz com motilidade progressiva, mas o efeito na capacidade de fertilização ainda é desconhecido (Johnston et al., 2001). Há amostras de sémen que foram congeladas durante 9 anos e apresentaram pouca ou nenhuma diminuição da motilidade quando descongeladas (Feldman & Nelson, 2004). Há autores que referem que o sémen quando congelado pode ser armazenado indefinidamente, e que com as técnicas e diluidores desenvolvidos nos últimos anos se podem obter taxas de concepção de 85% com sémen descongelado (Ponglowhapan et al., 2004).

Neste tipo de processamentos há sempre alguma variabilidade individual, reagindo os spz de cada cão de modo diferente à congelação, podendo haver mesmo uma amostra de sémen de excelente qualidade e sem grande percentagem de defeitos (como gotas citoplasmáticas e caudas dobradas ou enroladas) que não resista à congelação. Este facto levanta a suspeita das secreções prostáticas poderem ter alguma variabilidade química individual, que interfira com a conservação do sémen (Johnston et al., 2001; Schafer-Somi et al., 2006; A. R. Silva, et al., 2002). No entanto, esta hipótese não justifica o facto da integridade do acrossoma ser mais afectada pela congelação do que pela refrigeração (Hermansson & Linde Forsberg, 2006).

Os spz descongelados têm um período de semi-vida muito inferior ao de spz recentemente colhidos (Johnston et al., 2001). A manutenção da motilidade durante a incubação a 37°C após descongelação é o maior problema associado ao sémen de cão. A motilidade pode diminuir drasticamente em apenas 30 a 60 minutos. Este aspecto pode ser a razão porque a deposição de sémen descongelado na vagina cranial resulta numa taxa de concepção muito inferior à da inseminação intra-uterina. É aconselhável que na altura da inseminação se analise ao microscópio uma gota do sémen descongelado, para verificar a sua viabilidade e motilidade antes da execução da inseminação (Feldman & Nelson, 2004).

A técnica de criopreservação tem evoluído consideravelmente obtendo-se melhores resultados, principalmente devido ao uso de factores estabilizadores da membrana, da diminuição da concentração de glicerol nos diluidores, da alta concentração final de spz, duma congelação rápida moderada combinada com uma descongelação rápida, e também devido à adição do tampão Tris depois da descongelação (Schafer-Somi et al., 2006).

É de lembrar que dada a boa correlação obtida entre os spz que reagiram ao teste hipo-osmótico e a sua viabilidade, este é um teste valioso que se pode realizar ao sémen descongelado, associado à análise da motilidade, uma vez que esta não é o indicador mais fiável da qualidade do sémen descongelado (Pinto & Kozink, 2008).

Com a evolução desta área, há outro parâmetro de avaliação da qualidade do sémen que se pode tornar útil: a avaliação da função mitocondrial, uma vez que vários estudos provaram que esta é danificada pela criopreservação, e que a lesão da mitocôndria está associada à apoptose. Um modo relativamente simples de avaliar este parâmetro é a determinação de consumo de oxigénio pelos spz, usando um eléctrodo de Clark (Del Valle et al., 2009).

Dadas as características do sémen congelado de cão e o carácter especial da fisiologia reprodutiva da cadela, a data de execução da inseminação tem que ser muito precisa para se obter sucesso (Iguer-ouada & Verstegen, 2001). Os oócitos, na cadela, ovulam num estado ainda imaturo (oócito primário), não podendo ser fertilizados de imediato. Sofrem então uma maturação que dura cerca de 48 horas, findas quais os oócitos já fertilizáveis, permanecem viáveis no oviducto durante 4 a 5 dias. O sémen fresco de cão permanece viável no tracto reprodutor da cadela pelo menos 6 a 7 dias, mas no caso de sémen congelado tal não sucede. Devido ao curto tempo de vida dos spz depois de descongelados, a inseminação deve ser realizada só quando todos os oócitos tiverem ovulado e já estiverem maduros, ou seja 4 a 7 dias depois do pico de LH. A estimativa deste pico hormonal é feita por medições da concentração da progesterona sérica. Assume-se que o período fértil na cadela começa 4 dias após o início do aumento da concentração da progesterona. As inseminações devem ser feitas em dias seguidos, ou alternados, e no mínimo devem realizar-se 3 inseminações (Feldman & Nelson, 2004).

# ESTUDO

## 1. OBJECTIVOS

Este estudo teve como objectivo a comparação de 3 diluidores, relativamente aos seus efeitos na conservação do ejaculado de cão durante a refrigeração, avaliados através da motilidade, morfologia e integridade da membrana plasmática dos spz.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Serviço de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Técnica de Lisboa.

### 2.1. Animais

Foram utilizados 7 cães machos adultos, com idades compreendidas entre os 20 meses e os 7 anos, sendo 2 de raça Pastor Alemão, 4 de raça Labrador e 1 de raça Bobtail. Dois dos cães já tinham fertilidade comprovada. Um dos cães pertence a um particular, 3 ao Regimento de Lanceiros do Exército e outros 3 ao Grupo de Intervenção Cinotécnico da GNR. À excepção do cão de raça Bobtail, todos os outros são cães de trabalho no activo.

A cada animal foi feito o exame físico do estado geral e o exame andrológico, que consistiu na exteriorização e observação do pénis, palpação dos testículos e toque rectal. Foi feito também um exame ecográfico para avaliação das características e dimensão da próstata e dos testículos. As ecografias foram realizadas num ecógrafo Siemens com recurso a uma sonda microconvexa de 5-7,5 MHz.

### 2.2. Colheita e análise de sémen

Foram realizadas ao todo 9 colheitas (a 2 animais foram feitas duas colheitas, em dias diferentes), sempre pelo mesmo operador, para eliminar quaisquer variações na qualidade do sémen resultantes da técnica de colheita.

Os ejaculados foram recolhidos com recurso à estimulação manual, na ausência de uma cadela em cio, usando-se uma vagina artificial de látex com um tubo graduado acoplado. As primeiras gotas do ejaculado (1ª fracção) foram desprezadas, recolhendo-se a 2ª fracção (fracção espermática) para o 1º tubo, após a qual foi recolhida a fracção prostática (3ª fracção) para outro tubo. Imediatamente após a recolha, avaliou-se a cor e o volume da fracção espermática e o pH da fracção prostática com tiras medidoras de pH de escala de 1 a 14 (Whatman pH indicator paper; Whatman Internacional Ltd, Maidslon, England).

Os restantes procedimentos de avaliação incluíram: (1) determinação da concentração de spz e do número total de espermatozóides no ejaculado; (2) medição da percentagem de espermatozóides com movimento progressivo; (3) medição da percentagem de

espermatozóides vivos e com morfologia normal (a morfologia foi somente avaliada em spz vivos).

Foi feita a avaliação da motilidade e velocidade dos spz no ejaculado não diluído utilizando-se um microscópio óptico com platina aquecida. Calculou-se a percentagem de spz com motilidade progressiva e rectilínea, procedendo-se à contagem de 100 spz (contando-se 20 spz em cada campo óptico) numa ampliação total de 400x.

A percentagem de spz vivos e a percentagem de spz com defeitos morfológicos foram determinadas por observação, ao microscópio óptico, de esfregaços de sémen corados com eosina-nigrosina.

A concentração de spz foi medida por fotometria (SpermCue, Minitub™)

### 2.3. Diluidores de sémen

Todos os diluidores foram preparados na altura da colheita. A solução tampão foi previamente feita e congelada em vários tubos, de modo a descongelar-se de cada vez apenas as quantidades necessárias. A composição da solução tampão foi: tris(hidroximetil)-aminometano (3.025 g); ácido cítrico (1.7 g); e frutose (1.25 g) diluídos em água destilada (até perfazer 100 mL). Os diluidores foram acrescentados a cada amostra de sémen, consoante os volumes calculados, para obtenção da concentração de spz pretendida (ver ponto 2.4. Processamento e análise de sémen). Os três diluidores usados foram:

- Tris-gema de ovo: solução tampão; gema de ovo 20% (v/v); benzil-penicilina (1 mg/mL); sulfato de dihidroestreptomicina (1 mg/mL).
- Tris-leite 25%: solução tampão; leite 25% (v/v); benzil-penicilina (1 mg/mL); sulfato de dihidroestreptomicina (1 mg/mL).
- Tris-leite 50%: solução tampão; leite 50% (v/v); benzil-penicilina (1 mg/mL); sulfato de dihidroestreptomicina (1 mg/mL).

As gemas utilizadas eram provenientes de ovos frescos, sendo separadas da clara manualmente. Com o auxílio de uma seringa esterilizada, perfurou-se a membrana que envolve a gema e aspirou-se o volume necessário do seu conteúdo (Figura 3). Seguidamente, procedeu-se à centrifugação da gema de ovo (4000 rpm x 20 min) de modo a separar qualquer vestígio de clara. O leite utilizado nos diluidores era ultra-pasteurizado (UHT) e semi-gordo (1.5% matéria gorda).

**Figura 3** - Aspiração da gema para inclusão no diluidor



## 2.4. Processamento e análise de sémen

Após a determinação da concentração espermática e da análise do sémen fresco, o ejaculado de cada animal foi dividido em 3 alíquotas iguais. À exceção de um dos ejaculados (o ejaculado 3) que por ter pouco volume só foi possível estudar a influência de 2 dos diluidores (ovo e leite a 25%). Para cálculo do volume necessário de diluidor a adicionar, utilizou-se a fórmula  $V_1C_1 = V_2C_2$ , em que:  $V_1$  é o volume de cada alíquota de sémen;  $C_1$  é a concentração inicial de sémen fresco; e  $V_2$  o volume final, de cada alíquota após diluição, para se obter uma concentração final  $C_2$ , que foi estabelecida como  $20 \times 10^6$  spz/mL. O volume de diluidor a adicionar é  $V_2 - V_1$ . As três alíquotas de sémen, provenientes da mesma ejaculação, foram processadas com o menor intervalo de tempo possível entre elas e dum modo semelhante durante todo o processo de refrigeração, assim como armazenadas a 4°C no mesmo frigorífico. As amostras foram analisadas diariamente, durante 5 dias (incluindo o dia da colheita imediatamente após a diluição), agitando-se suavemente sempre os tubos, de forma a homogeneizar bem o sémen diluído. Após prévio aquecimento a 37°C foi feita a avaliação da percentagem de spz com motilidade progressiva e rectilínea (a partir de agora denominada motilidade) e da sua velocidade (classificando-a em rápida (3), moderada (2) ou lenta (1)). Posteriormente foi feita a avaliação dos spz vivos e morfológicamente normais dando particular atenção aos defeitos localizados na cauda.

Para avaliar a integridade da membrana plasmática dos spz, de forma a identificar qual dos diluidores conferia melhores condições de conservação em refrigeração, realizou-se o teste de turgescência num meio hipo-osmótico. Para tal, a 1 mL de solução hipo-osmótica previamente preparada (solução de frutose a 60 mOsmol) juntou-se 0,1 mL de sémen diluído. Os eppendorfs foram então colocados em banho-maria a 37°C durante 60 minutos. Findo este período, colocou-se uma gota entre lâmina e lamela e, com uma ampliação total de 400x, foi feita a avaliação de 100 spz distribuídos por vários campos ópticos, contabilizando aqueles que apresentavam anomalias na cauda, características da resposta a este teste e descritas por Jeyendran et al. (1984). A esse valor foi subtraída a percentagem de spz que já apresentava defeitos de cauda previamente ao teste, e que foram contabilizados no exame de morfologia, obtendo-se assim o verdadeiro número de spz com a membrana plasmática intacta.

## 2.5. Análise estatística

Os dados foram processados através de *software* (Statistica for Windows, StatSoft, Inc., 1995, Tulsa, OK, USA) e analisados por modelos lineares gerais, análise de univariância (ANOVA) para medições repetidas, usando o número de dias de refrigeração como efeito intra-grupo e o tipo de diluidor como efeito inter-grupo (efeitos fixos). Os níveis das medições repetidas foram  $n=5$ , para as determinações nos vários dias, da motilidade

progressiva rectilínea, % de spz vivos e normais e % de spz normais no teste hipo-osmótico. Os pressupostos da análise de variância foram testados pelas funções de *software* e sempre que não fosse observada uma distribuição normal dos dados, estes foram transformados ( $\log x+1$ ). Os efeitos significativos foram analisados e as médias comparadas através do teste de diferenças mínimas significativas (LSD). As diferenças foram consideradas significativas ao nível de probabilidade de  $P < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Exame Físico e Ecográfico

Todos os animais usados no estudo encontravam-se em bom estado de saúde, não tendo sido detectadas quaisquer alterações no exame do estado geral nem no exame andrológico. No exame ecográfico foram identificados 2 animais com hipertrofia prostática ligeira e com quistos intraprostáticos de dimensões moderadas em ambos os lobos (11,3 a 18,7 mm) (o ejaculado 2 provém de um destes cães, e os ejaculados 6 e 7 do outro). Qualquer um destes animais não apresentava qualquer sintomatologia. Ao nível dos testículos e epidídimo não foram encontradas quaisquer alterações em todos os animais.

#### 3.2. Qualidade do Sémen

Todos os ejaculados apresentaram uma coloração branca turva a opaca, à excepção do ejaculado 2 que se apresentou ligeiramente avermelhado, indicando a presença de sangue com origem prostática. Este ejaculado foi centrifugado a baixa rotação (300 g x 5 min) e, com auxílio duma pipeta, foi retirada a camada constituída maioritariamente por células sanguíneas.

As características do sémen fresco variaram entre ejaculados e estão resumidas na Tabela 2 e no Anexo I. De todos os parâmetros avaliados, o número total de spz foi aquele em que se observou maior diferença entre os animais.

De uma forma geral, todos os parâmetros avaliados encontram-se dentro dos valores considerados normais.

**Tabela 2** – Características do sémen fresco (n = 9 ejaculados)

	Média	Erro padrão	Máximo	Mínimo	Valores normais
<b>Volume 1<sup>a</sup>+2<sup>a</sup> fracções (mL)</b>	3,33	± 0,52	5,5	1	1 – 22 <sup>3</sup>



<b>Nº total de spz (x10<sup>6</sup>)</b>	767,3	± 199,6	1759	119	300 – 2000 <sup>1</sup>
<b>% motilidade progressiva</b>	92,1	± 1,49	98	82	≥70% <sup>1</sup>
<b>velocidade (classificada de 3 - 0)</b>	3	0	3	3	-
<b>pH da fracção prostática</b>	7	0	7	7	6,0 – 7,4 <sup>4</sup>
<b>% spz vivos e morf. normais</b>	84,9	± 1,59	92	79	≥60% <sup>2</sup>
<b>% defeitos cabeça</b>	2,4	± 0,63	6	0	<10% <sup>1</sup>
<b>% defeitos p. intermédia</b>	1,4	± 0,53	5	0	
<b>% defeitos cauda</b>	4,7	± 1,07	11	1	

### 3.3. Motilidade <sup>1</sup> (Johnston, Root Kustritz, & Olson, 2001); <sup>2</sup> (Oettle, 1993); <sup>3</sup> (Feldman & Nelson, 2004); <sup>4</sup> (Freshman, 2002)

A média dos spz com motilidade progressiva e rectilínea ao longo dos 4 dias de refrigeração está resumida na Tabela 3 e exemplificada no Gráfico 1.

**Tabela 3** – Motilidade (média ± erro padrão) do sémen preservado nos 3 diluidores ao longo do tempo

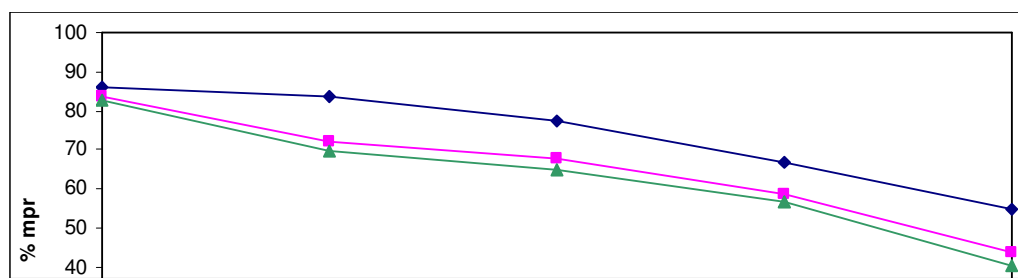
	0h	24h	48h	72h	96h
<b>Ovo</b>	86,2 ± 1,3 <sup>a</sup>	83,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	77,6 ± 3,5 <sup>a</sup>	66,7 ± 4,0 <sup>a</sup>	54,7 ± 6,2 <sup>a</sup>
<b>Leite 25</b>	83,4 ± 2,0 <sup>a</sup>	72,3 ± 3,2 <sup>b</sup>	67,8 ± 5,4 <sup>b</sup>	58,7 ± 6,3 <sup>ab</sup>	43,8 ± 7,3 <sup>b</sup>
<b>Leite 50</b>	82,6 ± 1,7 <sup>a</sup>	69,8 ± 4,7 <sup>b</sup>	65 ± 4,1 <sup>b</sup>	56,5 ± 6,4 <sup>b</sup>	40,4 ± 7,5 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Linhas com diferentes índices diferem significativamente (p < 0,05)

Imediatamente após a junção do diluidor (0 horas), não foram observadas diferenças significativas na % de spz com movimentos progressivos em nenhum dos diluidores utilizados. No entanto, após 24 horas de refrigeração, a motilidade média foi superior no diluidor tris-gema de ovo comparativamente com os diluidores tris-leite (p < 0,05), resultado que se manteve até às 96 horas de refrigeração, com excepção das 72 horas em que a diferença entre os diluidores tris-gema de ovo e tris-leite 25% não foi significativa.

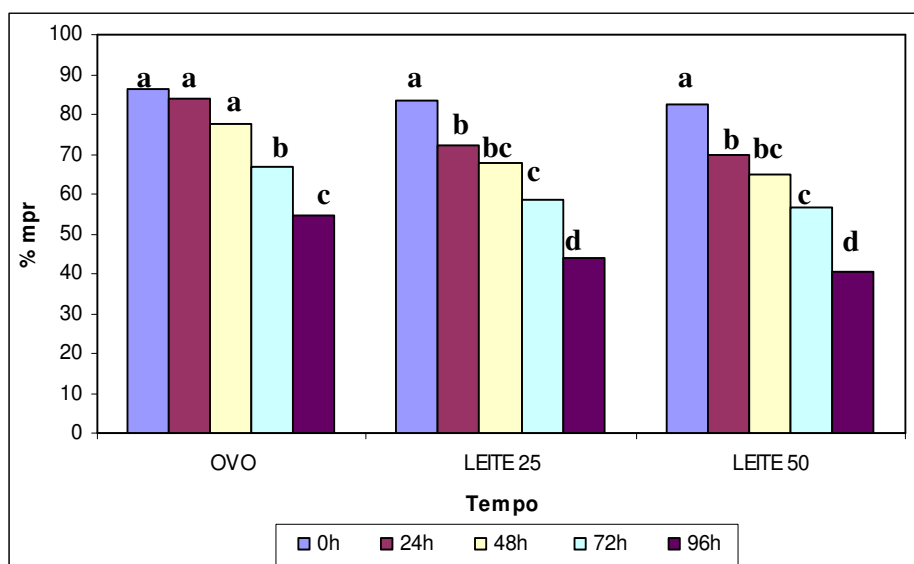
Entre os diluidores tris-leite, os valores médios da motilidade progressiva foram muito idênticos, não se observando diferenças significativas.

**Gráfico 1** - Variação da motilidade média, em cada diluidor, ao longo do tempo (n = 9 ejaculados).



A média dos spz com motilidade progressiva no sêmen diluído em tris-gema de ovo não diminuiu significativamente do dia 0 para o dia 2 (Gráfico 2). No entanto, esta diminuição foi significativa após 24 horas de refrigeração em ambos os diluidores tris-leite ( $p < 0,05$ ). A partir das 72 horas de refrigeração, a motilidade média dos spz foi significativamente menor nos 3 diluidores comparativamente com as 0 horas ( $p < 0,05$ ).

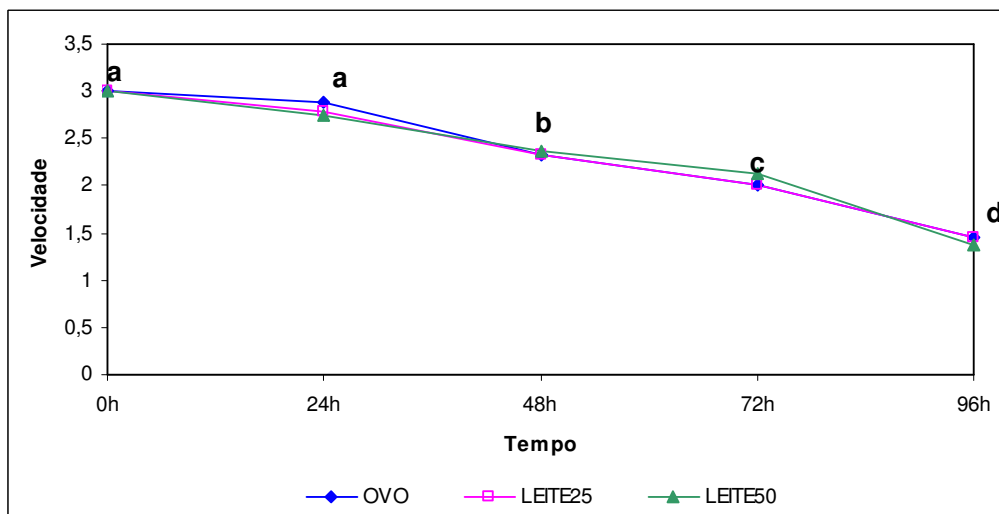
**Gráfico 2** - Variação da motilidade média, em cada diluidor, ao longo do tempo (n = 9 ejaculados).



Em cada diluidor, colunas com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

Independentemente do diluidor usado, a velocidade dos spz também diminuiu ao longo do tempo (Gráfico 3), observando-se uma diminuição significativa a partir das 24 horas de refrigeração ( $p < 0,01$ ), tornando-se mais acentuada às 96 horas.

**Gráfico 3 - Velocidade média dos spz ao longo do tempo, nos 3 diluidores diferentes.**

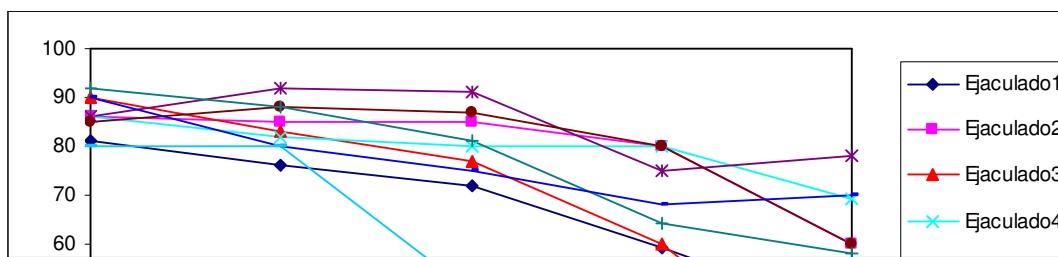


**Velocidade 3 = rápida; Velocidade 2 = moderada; Velocidade 1 = lenta; Velocidade 0 = parado.** Em cada diluidor, colunas com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

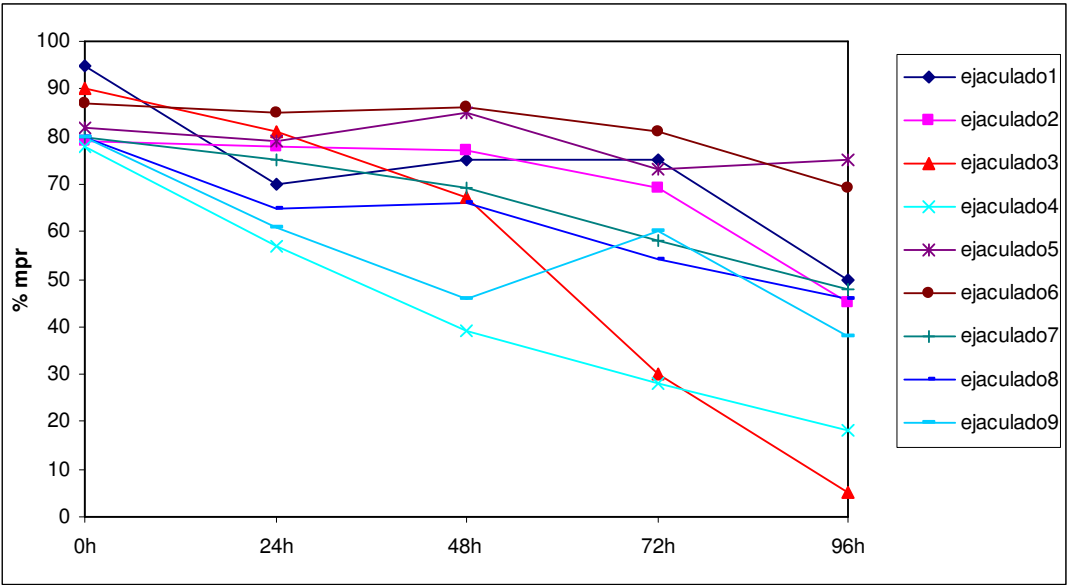
A análise da motilidade média permitiu verificar que existem diferenças significativas entre ejaculados ( $p < 0,0001$ ), ao longo dos diferentes tempos de refrigeração ( $p < 0,01$ ), bem como uma interação significativa dos efeitos inter-intra grupo ( $p < 0,05$ ).

Dos 9 ejaculados que foram alvo de estudo verificou-se que 3 ejaculados apresentaram motilidade inferior a 30% ao fim de 4 dias de refrigeração (ejaculados 3, 4 e 9), sendo que 2 destes (o ejaculado 3 em leite 25% e o ejaculado 4 em leite 50%) apresentaram motilidade inferior a 10% (Gráficos 4, 5 e 6). Estes 2 ejaculados são provenientes do mesmo animal, embora tenham sido recolhidos com mais de 1 mês de intervalo.

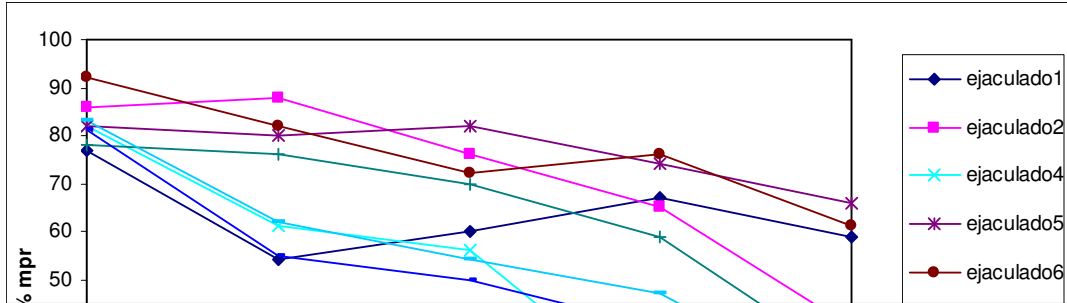
**Gráfico 4 - Motilidade média do sémen refrigerado durante 4 dias em diluidor tris-gema de ovo.**



**Gráfico 5 -** Motilidade média do sêmen refrigerado durante 4 dias em diluidor tris-leite 25%.



**Gráfico 6 -** Motilidade média do sêmen refrigerado durante 4 dias em diluidor tris-leite 50%.



### 3.4. Vitalidade e Morfologia

A percentagem de spz vivos e sem alterações morfológicas ao longo dos 4 dias de refrigeração está resumida na Tabela 4.

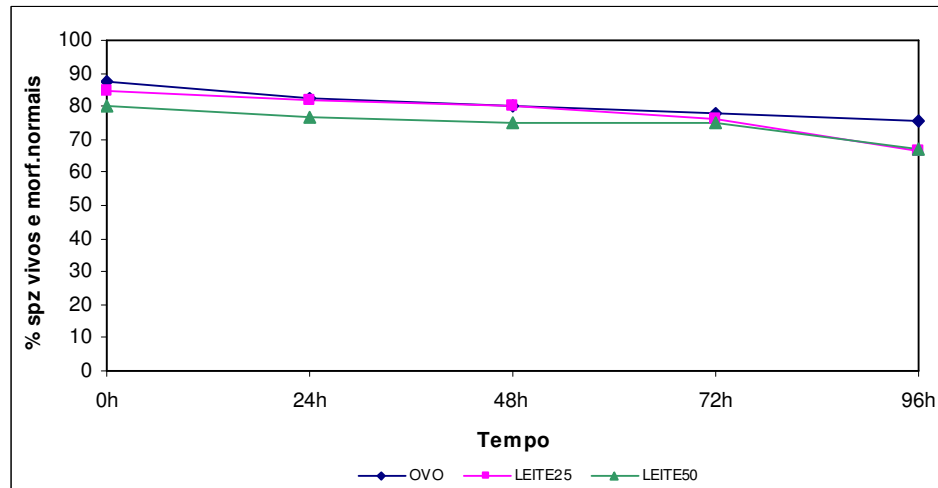
**Tabela 4** – Percentagem de espermatozóides vivos e morfológicamente normais (média  $\pm$  erro padrão) no sémen preservado nos 3 diluidores ao longo do tempo

	0h	24h	48h	72h	96h
<b>Ovo</b>	87,6 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	82,7 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	80,1 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	77,8 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	75,8 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>
<b>Leite 25%</b>	84,7 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	81,7 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	79,9 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	76,2 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	66,2 $\pm$ 5,0 <sup>b</sup>
<b>Leite 50%</b>	80,4 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>	76,6 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>	74,8 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>	74,8 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	67,1 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Linhas com diferentes índices diferem significativamente (0 e 96 horas:  $p < 0,01$ ; 24 horas:  $p < 0,05$ )

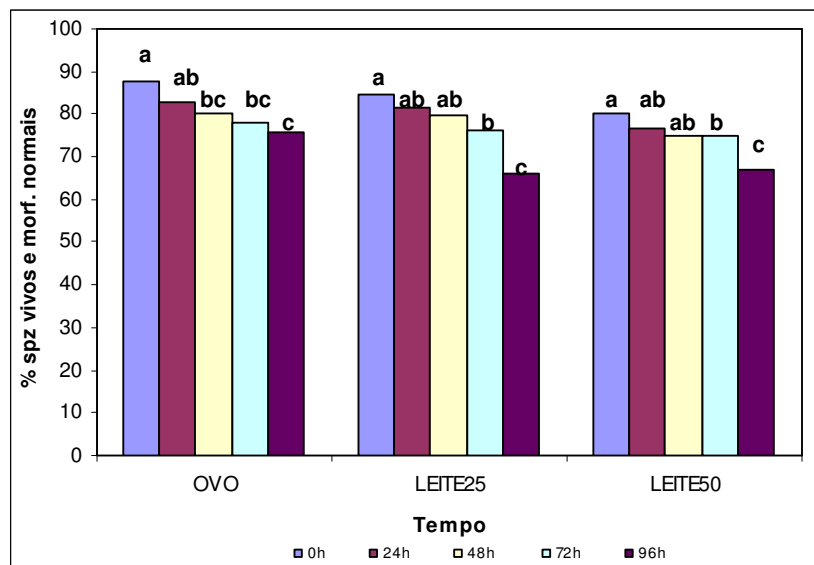
Imediatamente após a junção do diluidor (0 horas), verificou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) na % de spz vivos e normais no diluidor tris-leite 50%, comparativamente à do diluidor tris-gema de ovo, que se manteve até às 24 horas. Entre as 48 e 72 horas não se observaram diferenças significativas entre os 3 diluidores. No entanto, às 96 horas a % de spz vivos e normais no diluidor tris-gema de ovo apresentou-se superior à dos 2 diluidores tris-leite ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 7).

FMV-UTL **Gráfico 7** - Variação da média dos spz vivos e morfológicamente normais ao longo do tempo, nos 3 diluidores.



No diluidor tris-gema de ovo podemos observar uma diminuição significativa da % de spz vivos e normais às 48 horas de refrigeração, facto que só acontece ao fim de 72 horas nos diluidores tris-leite. No entanto, às 96 horas observa-se uma diminuição significativa da % de spz vivos e normais em todos os diluidores (Gráfico 8).

**Gráfico 8** - Variação da média dos spz vivos e morfológicamente normais ao longo do tempo, em cada diluidor.



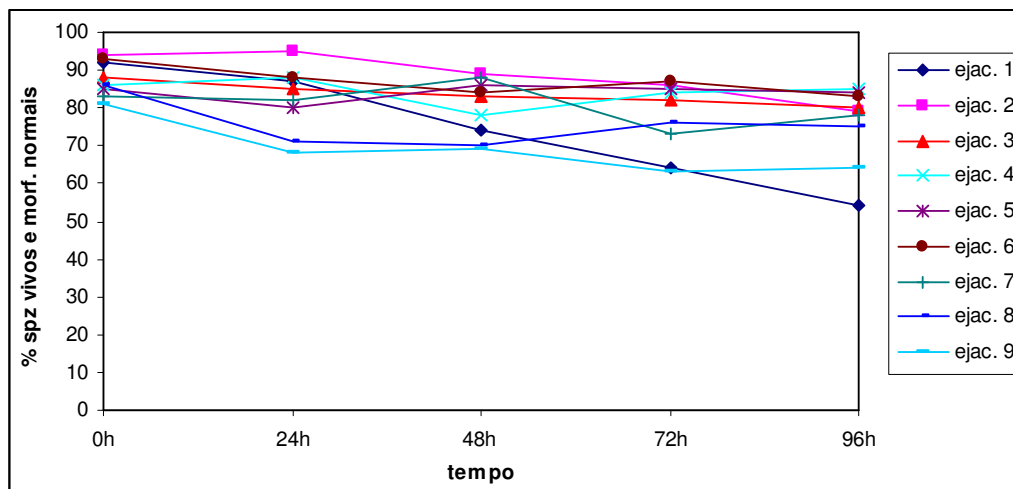
**Nota:** Em cada diluidor, colunas com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$  nos diluidores tris-gema de ovo e tris-leite 50%  $p < 0,01$  no diluidor tris-leite 25%)

Em relação a este parâmetro, não foram observadas diferenças significativas entre ejaculados ao longo do tempo.

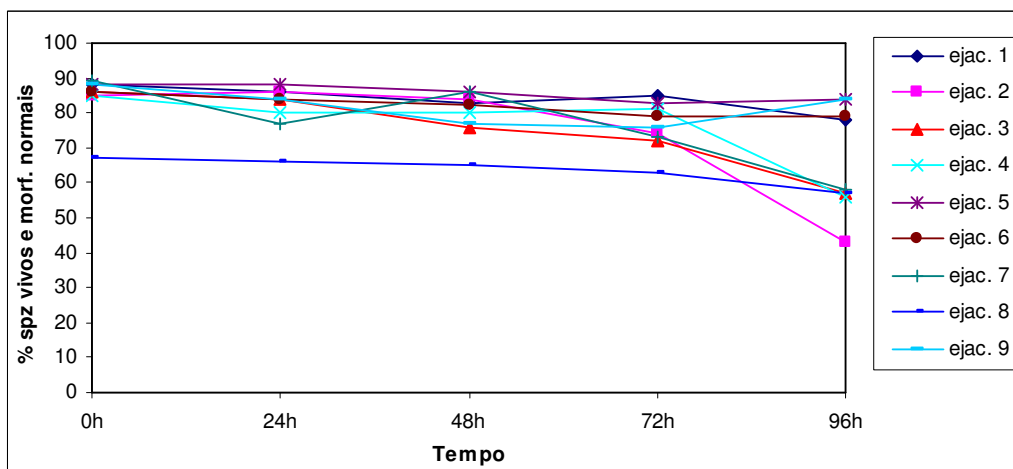
No diluidor tris-gema de ovo, apenas o ejaculado 1 apresentou uma % de spz vivos e normais inferior a 60%, ao fim das 96 horas em refrigeração (Gráfico 9).

No diluidor tris-leite 25%, após 96 horas de refrigeração, 5 ejaculados (2, 3, 4, 7 e 8) apresentaram menos de 60% de spz vivos e normais (Gráfico 10). Esta situação foi observada em 3 ejaculados no diluidor tris-leite 50% (4, 7 e 8) (Gráfico 11).

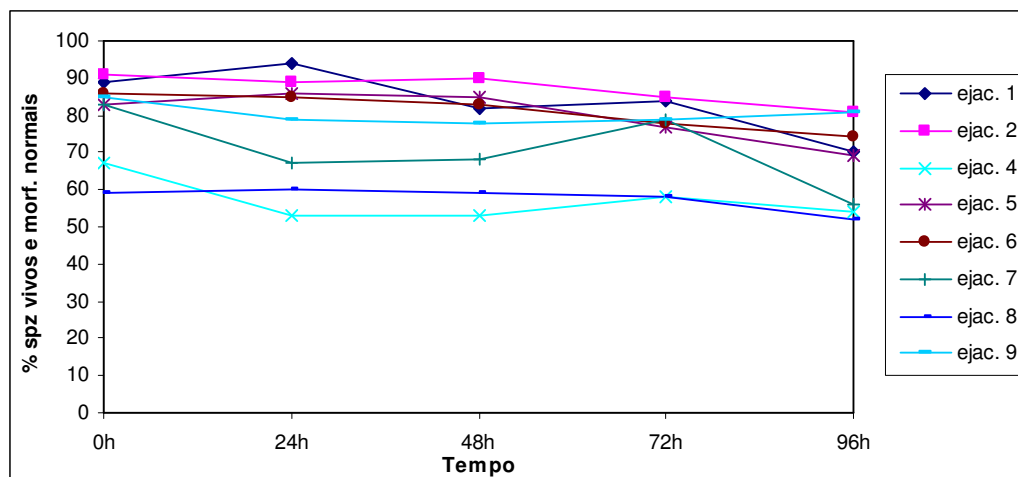
**Gráfico 9** - Percentagem de spz vivos e morfologicamente normais de cada ejaculado, refrigerado durante 4 dias no diluidor tris-gema de ovo.



**Gráfico 10** - Percentagem de spz vivos e morfologicamente normais de cada ejaculado, refrigerado durante 4 dias no diluidor tris-leite 25%.



**Gráfico 11** - Percentagem de spz vivos e morfologicamente normais de cada ejaculado, refrigerado durante 4 dias no diluidor tris-leite 50%.



Nos diluidores tris-gema de ovo e tris-leite a 50%, verificou-se um aumento significativo da quantidade de spz que apresentaram defeitos na cauda durante o período de refrigeração (Tabela 5).

**Tabela 5** – Percentagem de espermatozóides com defeitos nas caudas, antes da realização do teste hipo-osmótico.

	0h	24h	48h	72h	96h
<b>Ovo</b>	4 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,9 <sup>b</sup>	9,7 ± 1,8 <sup>bc</sup>	10,6 ± 2,4 <sup>bc</sup>	12,6 ± 3,8 <sup>c</sup>
<b>Leite 25%</b>	5,3 ± 1	6,9 ± 1,3	7,1 ± 1,1	6,8 ± 1,1	7,6 ± 1,2
<b>Leite 50%</b>	4,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	7 ± 1,1 <sup>ab</sup>	10,6 ± 1,4 <sup>b</sup>

<sup>abc</sup> Colunas com diferentes índices diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

### 3.5. Integridade da Membrana Plasmática (THO)

A integridade das membranas plasmáticas dos spz foi avaliada pelo teste hipo-osmótico (Tabela 6), determinando-se a percentagem de spz que apresentaram características de turgescência (Figuras 4 e 5).

**Tabela 6** - percentagem de spz com a membrana plasmática íntegra (média ± erro padrão) nos 3 diluidores ao longo do tempo



<b>Ovo</b>	81,9 ± 2,7	75,9 ± 2,7	70,2 ± 3,5	70,2 ± 3,1	61,9 ± 3,1
<b>Leite 25</b>	78,6 ± 4,1	77,3 ± 2,9	76,1 ± 1,9	75,4 ± 2,3	60,4 ± 4,6
<b>Leite 50</b>	79,8 ± 3,9	76,3 ± 5,2	75,6 ± 4,9	73,9 ± 3,7	66,4 ± 3,9

**Figura 4** – Espermatozóides com cauda enrolada (seta) característica após teste hipo-osmótico (x1000)

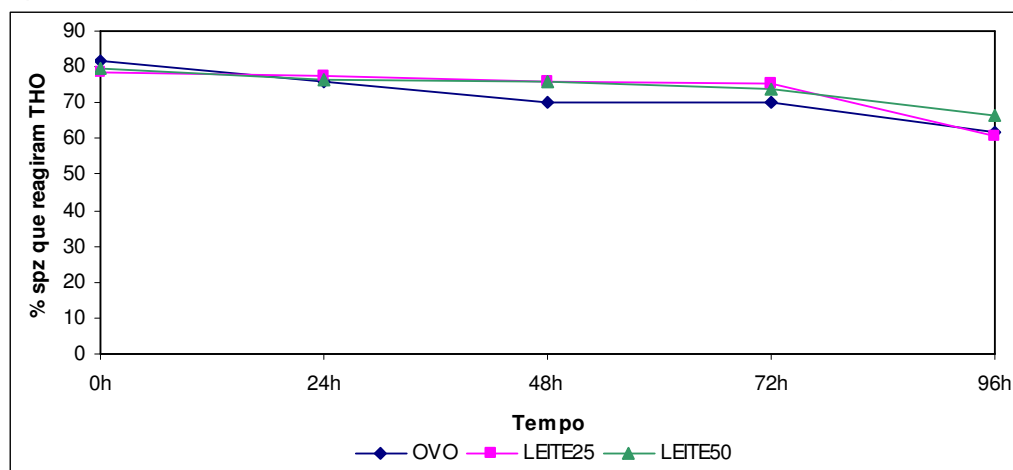


**Figura 5** – Espermatozóides com cauda enrolada (seta) característica após teste hipo-osmótico (x1000)



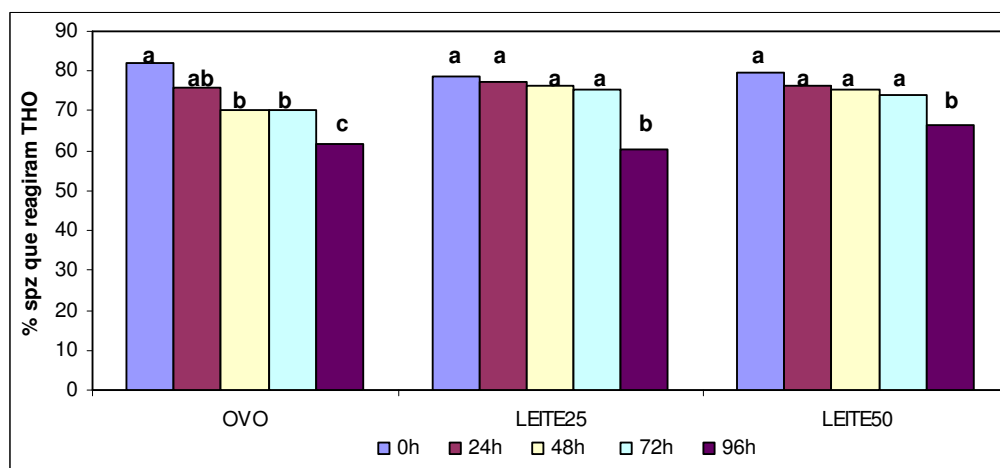
Durante o período de refrigeração não foram observadas diferenças entre diluidores em relação ao teste hipo-osmótico (Gráfico 12).

**Gráfico 12** - Variação da % de spz com membrana íntegra, estimada pelo teste hipo-osmótico nos 3 diluidores durante os 4 dias de refrigeração (n = 9 ejaculados).



No diluidor tris-gema de ovo, observou-se uma diminuição da % de spz com membrana plasmática íntegra às 48 horas de refrigeração ( $p < 0,02$ ), que se acentuou às 96 horas. Em ambos os diluidores tris-leite, só se observou uma diminuição significativa da % de spz com membrana íntegra às 96 horas de refrigeração (Gráfico 13), tendo sido mais acentuada no diluidor tris-leite 25% ( $p < 0,001$ ) do que no tris-leite 50% ( $p < 0,05$ ).

**Gráfico 13** - Variação da % de spz com membrana íntegra, estimada pelo teste hipo-osmótico em cada diluidor, durante os 4 dias de refrigeração (n = 9 ejaculados).

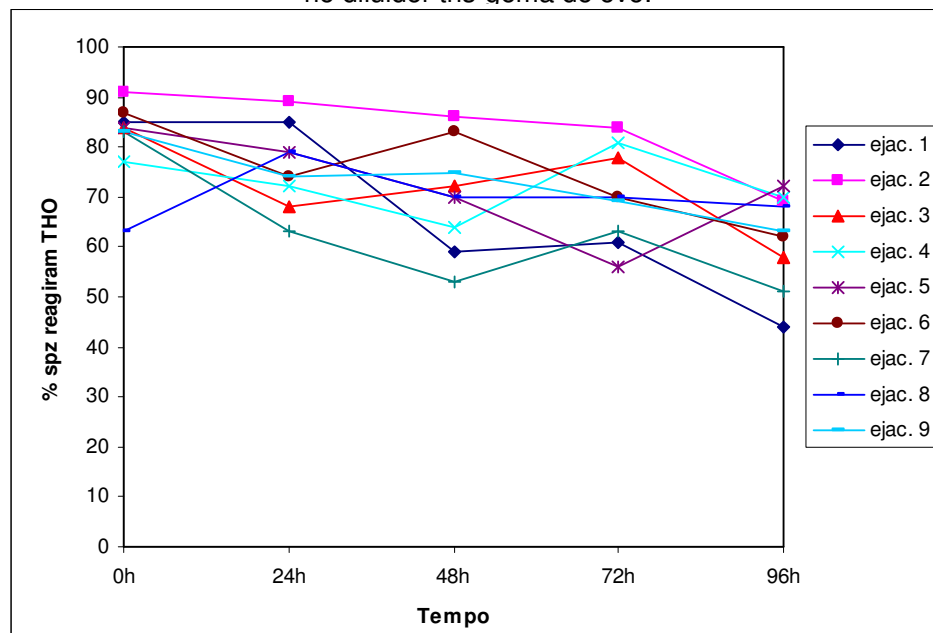


Em cada diluidor, colunas com diferentes letras diferem significativamente:  $p < 0,02$  entre tempos no diluidor tris- gema de ovo;  $p < 0,001$  entre tempos no diluidor tris-leite 25%;  $p < 0,05$  entre tempos no diluidor tris-leite 50%.

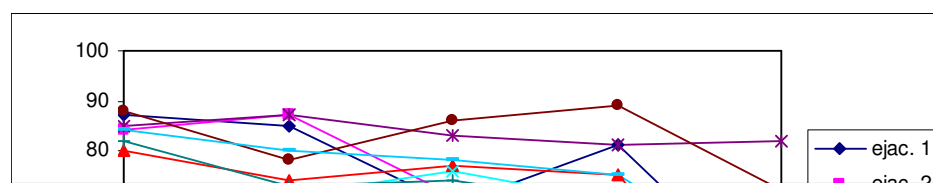
A variação entre os diferentes ejaculados foi um pouco heterogênea em todos os diluidores, mas estas variações não foram significativas. Ao fim dos 4 dias de refrigeração, no diluidor tris-gema de ovo (Gráfico 14), os ejaculados que apresentavam menor % de spz com

membrana plasmática integra foram o 1 e o 7. No diluidor tris-leite 25% (Gráfico 15) foram os ejaculados 1, 3 e 7 que apresentaram piores resultados ao fim das 96 horas. E no diluidor com leite a 50% (Gráfico 16) foram os ejaculados 4, 7 e 8, os que tinham menor % de spz com a membrana plasmática integra.

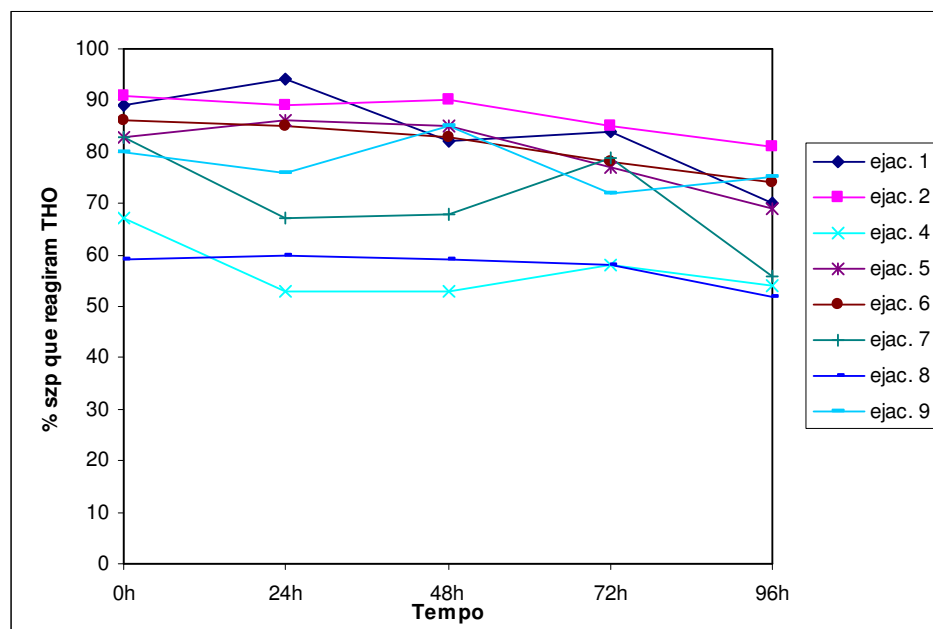
**Gráfico 14** - Espermatozóides com membrana plasmática integra (% spz reagiram THO) conservados a 4 °C durante 4 dias no diluidor tris-gema de ovo.



**Gráfico 15** - Espermatozóides com membrana plasmática integra (%spz reagiram THO) conservados a 4 °C durante 4 dias no diluidor tris-leite 25%.



**Gráfico 16** - Espermatozóides com membrana plasmática íntegra (%spz reagiram THO) conservados a 4 °C durante 4 dias no diluidor tris-leite 50%.



#### 4. DISCUSSÃO

A amostra do estudo (sémen fresco) foi muito heterogénea em termos de número total de spz, a variando de  $119 \times 10^6$  a  $1759 \times 10^6$ , com apenas 2 ejaculados (3 e 7) a apresentarem valores ligeiramente inferiores ao considerado mínimo normal ( $300 \times 10^6$ ) (Root Kustritz, 2007). Em relação à motilidade, todos os ejaculados apresentaram uma percentagem de spz com motilidade progressiva e rectilínea superior a 80%, sendo a média de 92%. Todos os ejaculados apresentaram uma percentagem de spz com morfologia normal elevada, com uma média de 84,9%, estando a maioria dos defeitos localizada na cauda. O pH da fracção prostática foi invariavelmente 7, e embora o valor esteja no intervalo de referência considerado normal, foi uma medição pouco precisa. Tal facto sucedeu porque as tiras medidoras de pH utilizadas tinham uma escala mínima de 1 valor. Para este tipo de medições, é recomendado o uso de medidores de pH com capacidade de medir em intervalos de 0,5 no máximo. Os cães utilizados para este estudo não foram seleccionados pela qualidade do sémen, existindo assim variações individuais das características do sémen, como ocorre nos casos da prática clínica.

A qualidade do ejaculado 2 após a refrigeração não parece ter sido afectada pelo facto de ter estado em contacto com sangue, de origem prostática, no momento da colheita. Este resultado está de acordo com Freshman (2002), que afirmou que a quantidade de sangue que possa estar presente num ejaculado, devido a um problema prostático, não afecta a motilidade espermática se estiver menos de 6 horas em contacto.

Apesar de dois dos animais apresentarem a próstata hipertrofiada (ejaculados 2, 6 e 7), este facto parece que não afectou grandemente a viabilidade do sémen durante a refrigeração. Embora o ejaculado 7 tenha apresentado baixa percentagem de spz com morfologia normal e com membrana plasmática íntegra no final do período de refrigeração, o mesmo não aconteceu com os ejaculados 6 (proveniente do mesmo animal) e 2.

Uma vez que os spz só se mantêm viáveis no líquido prostático durante pouco tempo, para resistirem ao transporte e estarem em condições no momento da I.A., há que se proceder à refrigeração e diluição do sémen com diluidores apropriados (Rota *et al.*, 1995). Dado o facto de que em alguns países já existe proibição da importação de sémen refrigerado com diluidores à base de gema de ovo, procurou-se neste estudo testar outro diluidor de fácil preparação, que possa servir como alternativa. Foram testadas duas concentrações diferentes de leite, com o objectivo de determinar de que modo a concentração de leite pode interferir na qualidade do sémen refrigerado ou se esta não é um factor limitante, facilitando assim a preparação do diluidor.

Para se avaliar convenientemente a capacidade de conservação que um determinado diluidor proporciona a uma amostra de sémen, teria que se testar o potencial de fertilização desse sémen *in vivo*, após todo o processo de refrigeração. Mas, como já foi referido

(Rijsselaere et al., 2005), esta metodologia demoraria demasiado tempo, além de resultar no nascimento de cachorros indesejados. Assim sendo, torna-se lógico que para uma avaliação ainda assim objectiva, é necessário avaliar vários parâmetros relacionados com a qualidade espermática para se obter uma melhor correlação com a fertilidade *in vivo*. Desta forma, avaliou-se a motilidade, morfologia e a integridade da membrana plasmática dos spz ao longo do tempo, para caracterizar a capacidade de conservação proporcionada por cada diluidor.

Embora a motilidade tenha sido avaliada de forma subjectiva por não haver disponibilidade dum sistema computadorizado (CASA), estas duas técnicas já foram comparadas e os resultados obtidos tiveram boas taxas de correlação (Root Kustritz, 2007).

A avaliação da motilidade em platina aquecida é justificada pela interferência negativa da refrigeração na velocidade e linearidade dos movimentos dos spz (Freshman, 2002; Schafer-Somi & Aurich, 2007). Tal como Freshman (2002) já tinha referido, verificou-se neste estudo que substâncias viscosas como a gema de ovo provocam alguma aglutinação dos spz, dificultando a avaliação da motilidade e da morfologia.

Apesar de já ter sido demonstrada a capacidade de vários diluidores para preservar a motilidade dos spz por períodos superiores a 15 dias (Verstegen et al., 2005), neste estudo a avaliação foi feita durante 4 dias por este ser o período de refrigeração mais frequentemente usado, quando o sémen se destina a I.A.

Como seria de esperar, à semelhança de vários estudos realizados sobre sémen de cão, neste estudo a motilidade progressiva das amostras também diminuiu ao longo do tempo. Este decréscimo atribui-se à acumulação de metabolitos, resultantes do metabolismo dos spz, que poderão levar a alterações de osmolaridade e pH no diluidor e que por sua vez têm influência na funcionalidade dos spz, acabando por prejudicar a sua motilidade. Outra razão possível é a depleção do substrato energético no meio. Qualquer uma destas hipóteses é reforçada pelo estudo de Verstegen *et al.* (2005) que num período em que os spz já apresentavam uma diminuição da motilidade, com a simples substituição do diluidor conseguiu recuperar uma percentagem considerável de spz com motilidade progressiva. Podemos assim especular que em meios com pouca energia disponível, os spz adoptam um estado de dormência para reduzir o consumo energético. Contudo, para melhor explicação destes resultados são necessários mais estudos.

Neste estudo verificou-se que a motilidade dos spz no diluidor tris-gema de ovo só diminuiu significativamente às 72 horas de refrigeração, enquanto que o sémen nos diluidores de tris-leite apresentou um decréscimo da % de spz com motilidade progressiva logo às 48 horas de refrigeração. Esta diferença pode dever-se à existência de alguma substância na gema de ovo que seja fonte extra de energia (além da frutose adicionada ao diluidor) ou que confira algumas propriedades anti-oxidantes, protegendo os spz da acção acumulativa de

metabolitos durante mais tempo. Apesar de, ao longo de todo o tempo de refrigeração, haver alguma diferença na motilidade entre os spz no diluidor tris-gema de ovo comparativamente aos diluidores tris-leite, ao fim das 96h de refrigeração a % de spz com motilidade progressiva ainda é aceitável em todos os diluidores (>40%). Pelos resultados obtidos, parece não haver influência da concentração de leite do diluidor (pelo menos entre 25 a 50%) na motilidade. No entanto, nos casos de ejaculados com motilidade baixa, a I.A. intra-uterina deverá ser utilizada.

A percentagem de spz com motilidade progressiva foi o parâmetro (dos 3 avaliados) em que se observou maior variação de valores entre os vários ejaculados. Embora a amostra estudada tenha sido pequena, podemos concluir que cada ejaculado reage de forma diferente consoante o diluidor. Neste estudo, os ejaculados que apresentaram piores valores de motilidade ao fim dos 4 dias foram os ejaculados 3, 4 e 9. O ejaculado 3 foi dos que apresentou pior percentagem de motilidade progressiva nos diluidores tris-gema de ovo e tris-leite 25%. O ejaculado 4 foi dos piores nos 2 diluidores de leite, apresentando bom comportamento no diluidor tris-gema de ovo. O ejaculado 9 apresentou uma baixa % de spz com motilidade progressiva em todos os diluidores.

Feldman & Nelson (2004) verificaram que o primeiro ejaculado de um cão, após repouso sexual prolongado, pode conter uma maior quantidade de spz antigos e mortos (por estarem demasiado tempo armazenados no epidídimo) e daí resultar uma diminuição significativa da percentagem de spz com motilidade progressiva. Assim sendo, é conveniente fazer-se uma colheita de sémen prévia antes da colheita para inseminação.

Tal como a motilidade, a velocidade também diminuiu ao longo do tempo, apresentando uma reacção semelhante em todos os diluidores. O estado de “poupança de energia”, a acumulação de metabolitos ou a disponibilidade de pouca energia no diluidor são também razões válidas para a diminuição da velocidade.

A morfologia foi outro dos parâmetros escolhidos para avaliar as amostras de sémen ao longo do tempo pois, como Oettle (1993) demonstrou, quanto maior for a percentagem de spz vivos e morfologicamente normais, mais elevada será a taxa de fertilização. O valor considerado mínimo aceitável para este estudo foi 60% de spz vivos e morfologicamente normais, tal como sugerido por Oettle (1993).

Durante o período de refrigeração, observou-se um aumento do número de spz com caudas enroladas e dobradas, o que contribuiu para a diminuição da % de spz vivos e morfologicamente normais, mantendo-se relativamente constante a percentagem de spz vivos. O diluidor tris-gema de ovo foi o que apresentou melhores características em relação a este parâmetro, principalmente no fim do período de refrigeração. No entanto, entre as 48 e as 72 horas não houve diferenças significativas entre diluidores. A justificação para esta diferença pode ser o facto da gema de ovo ter na sua composição substâncias que de

alguma forma protegem os spz de sofrer alterações a nível membranar, e que se podem manifestar por alterações na cauda ou no acrossoma. Pensa-se que a gema de ovo previne a perda ou substitui os fosfolípidos da membrana dos spz (A. R. Silva et al., 2002; Verstegen et al., 2005) e que confere protecção contra alterações da pressão osmótica (Witte et al., 2009), no entanto os mecanismos responsáveis ainda não foram determinados.

Em termos da reacção de cada ejaculado aos diferentes diluidores é difícil chegar a alguma conclusão. Verificou-se que os ejaculados 4, 7 e 8 ao fim das 96 horas em refrigeração apresentavam uma % baixa de spz normais (<60%) em ambos os diluidores tris-leite, mas tal não aconteceu no diluidor tris-gema de ovo. Neste último diluidor, o único ejaculado que apresentou uma % de spz normais baixa foi o 1, em consequência de se ter observado uma % de defeitos na cauda extraordinariamente elevada (41% às 96 horas). A justificação para este facto é difícil, uma vez que este mesmo ejaculado apresentou percentagens de spz vivos e normais bastante aceitáveis em ambos os diluidores tris-leite.

Os diluidores testados têm certamente osmolaridades diferentes entre si, podendo-se colocar a hipótese de existir uma variabilidade entre animais na tolerância dos spz a diferentes osmolaridades. No entanto, neste estudo não foram determinadas as osmolaridades dos vários diluidores, impossibilitando desta forma chegar a qualquer conclusão acerca desta matéria. Como já referido anteriormente, com a acumulação de metabolitos ao longo do tempo da refrigeração, são de esperar alterações de osmolaridade (que tende a aumentar) e de pH (que tende a diminuir) nos diluidores. Estes 2 parâmetros podem ter alguma influência na qualidade do sémen após algum tempo em refrigeração e também deviam ter sido avaliados.

Neste estudo, para se avaliar a integridade plasmática dos spz, juntamente com a avaliação morfológica, realizou-se também o teste hipo-osmótico. É importante realizar estes dois exames porque se estão a avaliar características diferentes da membrana plasmática. Isto porque na avaliação morfológica com uso de corantes, por exemplo os spz mortos permitem a entrada de eosina devido a alterações na membrana plasmática. Estes mesmos spz, provavelmente não iriam sofrer turgescência numa solução hipo-osmótica. No entanto, podem haver spz vivos cujas membranas não estando totalmente integras, e portanto incapazes de reagir ao stress hipo-osmótico, são no entanto capazes de impedir a entrada da eosina (Jeyendran et al., 1984).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que não houve diferenças na percentagem de spz com membrana plasmática integra entre os diferentes diluidores. No entanto, em cada diluidor verificaram-se diferenças significativas da % de spz com membrana plasmática integra ao longo do tempo (no diluidor tris-gema de ovo a partir das 48 horas e nos diluidores tris-leite a partir das 96 horas). Sendo as membranas dos spz extremamente ricas em ácidos gordos polinsaturados, tornam-se muito susceptíveis à



peroxidação lipídica. Este facto é reforçado, quando em condições experimentais os spz ficam expostos a uma concentração de oxigénio muito superior, comparativamente às suas condições fisiológicas normais (Beccaglia M. et al., 2008). A oxidação das membranas plasmáticas leva a alterações metabólicas e altera as lipoproteínas, conduzindo à perda parcial ou total da funcionalidade das membranas dos spz (Beccaglia M. et al., 2008; Monteiro et al., 2009). Os resultados deste estudo parecem sugerir que qualquer dos diluidores testados confere o mesmo grau de protecção às membranas plasmáticas dos spz durante a refrigeração. No entanto, os valores obtidos neste estudo com o diluidor tris-gema de ovo foram inferiores aos apresentados no estudo de Rota *et al.* (1995) com o mesmo diluidor, não havendo referência se os autores terão ou não subtraído a % de spz com defeitos na cauda que deveria ter sido previamente determinada.

Entre os dois diluidores de tris-leite testados não parece haver diferenças, levando a pensar que a concentração de leite no diluidor não tem que ser necessariamente calculada com rigor, uma vez que entre 25% a 50% (v/v) os resultados são muito semelhantes.

## 5. CONCLUSÃO

Embora os parâmetros avaliados tenham sido ligeiramente melhores com o diluidor tris-gema de ovo, podemos concluir que o diluidor tris-leite é um potencial substituto, podendo ser utilizado nos casos de envio de sémen para países em que a entrada de componentes de ovo está interdita.

Até à data não há muitos estudos que comparem diluidores para sémen refrigerado com estes componentes (gema de ovo/leite ultra-pasteurizado), sendo necessário que em estudos futuros se realize a avaliação de parâmetros mais específicos, recorrendo-se à fluorescência para determinação não só da integridade da membrana plasmática, como da integridade do ADN e do acrossoma. Numa fase posterior, deverá ser testada a longevidade máxima dos spz nestes diluidores, bem como a capacidade de fertilização *in vitro* e *in vivo*.

## BIBLIOGRAFIA

- Abe, Y., Lee, D. S., Sano, H., Akiyama, K., Yanagimoto-Ueta, Y. & Asano, T. (2008). Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. *J Reprod Dev*, 54(4), 290-294.
- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S. & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2), 269-279.
- Aitken, R. J. & McLaughlin, E. A. (2007). Molecular mechanisms of sperm capacitation: progesterone-induced secondary calcium oscillations reflect the attainment of a capacitated state. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 63, 273-293.
- Althouse, G. C., Ko, J. C., Hopkins, S. M. & Evans, L. E. (1991). Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. *J Am Vet Med Assoc*, 199(2), 227-229.
- Aurich, C. & Spersger, J. (2007). Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 67(5), 912-918.
- Beccaglia M., Anastasi P., Chigioni S. & G.C., L. (2008). *Tris-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen*. Paper presented at the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biennial EVSSAR Congress, Vienna, Austria.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E. & Desherces, S. (2010). Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci*, 119(3-4), 305-313.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S. & Delhomme, G. (2008). The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 70(9), 1478-1488.
- Bergeron, A., Crete, M. H., Brindle, Y. & Manjunath, P. (2004). Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod*, 70(3), 708-717.
- Blendinger, K. (2007a). *collection and evaluation of the semen in the dog*. Paper presented at the SCIVAC congress, Rimini, Italy.
- Blendinger, K. (2007b). *How to organize export/import of frozen semen towards to/from countries*. Paper presented at the SCIVAC Congress, Rimini, Italy.
- Cunningham, J. G. (2002). *Textbook of veterinary physiology* (3rd ed.). Philadelphia, Pa.: W.B. Saunders Co.

- Curry, M. R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod*, 5(1), 46-52.
- da Rocha, A. A., da Cunha, I. C., Ederli, B. B., Albernaz, A. P. & Quirino, C. R. (2009). Effect of daily food supplementation with essential fatty acids on canine semen quality. *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2, 313-315.
- de Cassia Soares Cardoso, R., Silva, A. R. & da Silva, L. D. (2006). Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. *Anim Reprod Sci*, 92(3-4), 384-391.
- Del Valle, I., Mendoza, N., Casao, A., Cebrian-Perez, J. A., Perez-Pe, R. & Muino-Blanco, T. (2009). Significance of Non-conventional Parameters in the Evaluation of Cooling-induced Damage to Ram Spermatozoa Diluted in Three Different Media. *Reprod Domest Anim*.
- England, G. C. (1999). Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*, 52(6), 981-986.
- Ettinger, S. J. & Feldman, E. C. (2010). *Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and the cat* (7th ed.). St. Louis, Mo.: Elsevier Saunders.
- Eulenberger, K., Schafer-Somi, S. & Aurich, C. (2009). Effect of different concentrations of ascorbic acid on motility, membrane integrity and chromatin status of frozen-thawed canine spermatozoa within six hours of storage at 37 degrees C. *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2, 354-358.
- Farstad, W. (2008). *Cryopreservation of canine semen - new challenges*. Paper presented at the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biennial EVSSAR Congress, Vienna, Austria.
- Farstad, W. & Waterhouse, K. (2006). *Sources of variation that contribute to the "freezability" of semen*. Paper presented at the The 5th Biannual Congress of The European Veterinary Society for Small Animal Reproduction, Budapest.
- Feldman, E. C. & Nelson, R. W. (2004). *Canine and feline endocrinology and reproduction* (3rd ed.). St. Louis, Mo.: Saunders.
- Freshman, J. L. (2002). Semen collection and evaluation. *Clin Tech Small Anim Pract*, 17(3), 104-107.
- Henkel, R. (2005). The impact of oxidants on sperm function. *Andrologia*, 37(6), 205-206.
- Hermansson, U. & Linde Forsberg, C. (2006). Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, 65(3), 584-593.
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47-58.

- Iguer-ouada, M. & Verstegen, J. P. (2001). Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55(2), 671-684.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G. & Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, 70(1), 219-228.
- Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V. & Olson, P. S. (2001). *Canine and feline theriogenology* (1st ed.). Philadelphia, PA: Saunders.
- Kutzler, M. A. (2005). Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64(3), 747-754.
- L. LeFrappier, M., L. Walston, B. & Whisnant, C. S. (2010). Comparison of Various Extenders for Storage of Cooled Stallion Spermatozoa for 72 hours. *journal of Equine Veterinary Science*, 30.
- Lopes, B., Cunha, I., Silva, J., Vidal Junior, M. & Vianna, A. (2008). *Canine Chilled Semen: Influence of Latex and Air*. Paper presented at the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction and 6th Biennial EVSSAR Congress, Vienna, Austria.
- Lopes, G., Simoes, A., Ferreira, P., Martins-Bessa, A. & Rocha, A. (2009). Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. *Anim Reprod Sci*, 112(1-2), 158-163.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A. & Menard, M. (2002). Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod*, 67(4), 1250-1258.
- Martinez, A. I. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 209-224.
- Martins, M. I., Padilha, L. C., Souza, F. F. & Lopes, M. D. (2009). Fertilizing capacity of frozen epididymal sperm collected from dogs. *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2, 342-344.
- Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, P. & Ververidis, H. N. (2009). Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 112(1-2), 119-135.
- Monteiro, J. C., Goncalves, J. S., Rodrigues, J. A., Lucio, C. F., Silva, L. C. & Assumpcao, M. E. (2009). Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2, 359-362.
- Nizanski, W., Klimowicz, M., Partyka, A., Savic, M. & Dubiel, A. (2009). Effects of the inclusion of Equex STM into Tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5 degrees C. *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2, 363-365.

- Oettle, E. E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil Suppl*, 47, 257-260.
- Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galan, Y., Varela-Fernandez, E., Gallardo-Bolanos, J. M., Muriel, A. & Gonzalez-Fernandez, L. (2008). Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J Androl*, 29(2), 213-221.
- Pagl, R., Aurich, J. E., Muller-Schlosser, F., Kankofer, M. & Aurich, C. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 degrees C. *Theriogenology*, 66(5), 1115-1122.
- Palomo, M. J., Fernandez-Novell, J. M., Pena, A., Guinovart, J. J., Rigau, T. & Rodriguez-Gil, J. E. (2003). Glucose- and fructose-induced dog-sperm glycogen synthesis shows specific changes in the location of the sperm glycogen deposition. *Mol Reprod Dev*, 64(3), 349-359.
- Pinto, C. R. & Kozink, D. M. (2008). Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 104(2-4), 450-455.
- Ponglowhapan, S., Chatdarong, K., Sirivaidyapong, S. & Lohachit, C. (2006). Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology*, 66(6-7), 1633-1636.
- Ponglowhapan, S., Essen-Gustavsson, B. & Linde Forsberg, C. (2004). Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62(8), 1498-1517.
- Rigau, T., Farre, M., Ballester, J., Mogas, T., Pena, A. & Rodriguez-Gil, J. E. (2001). Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, 56(5), 801-815.
- Rigau, T., Rivera, M., Palomo, M. J., Fernandez-Novell, J. M., Mogas, T. & Ballester, J. (2002). Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*, 123(4), 579-591.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D. & de Kruif, A. (2005). New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, 64(3), 706-719.
- Rodriguez-Martinez, H. (2000). Evaluation of Frozen Semen: Traditional and New Approaches.
- Root Kustritz, M. V. (2007). The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, 68(3), 329-337.
- Rota, A., Strom, B. & Linde-Forsberg, C. (1995). Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 degrees C. *Theriogenology*, 44(6), 885-900.
- Schafer-Somi, S. & Aurich, C. (2007). Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Anim Reprod Sci*, 102(1-2), 1-13.

- Schafer-Somi, S., Kluger, S., Knapp, E., Klein, D. & Aurich, C. (2006). Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, 66(2), 173-182.
- Shahiduzzaman, A. K. & Linde-Forsberg, C. (2007). Induced immotility during long-term storage at +5 degrees C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 68(6), 920-933.
- Silva, A. R., de Cassia Soares Cardoso, R., Uchoa, D. C. & MacHado da Silva, L. D. (2002). Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *Vet J*, 164(3), 244-246.
- Silva, L. D. & Verstegen, J. P. (1995). Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 44(4), 571-579.
- Strom Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C. & Rodriguez-Martinez, H. (2000a). Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J Reprod Fertil*, 119(2), 201-206.
- Strom Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C. & Rodriguez-Martinez, H. (2000b). Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J Reprod Fertil*, 119(1), 77-83.
- Szasz, F., Sirivaidyapong, S., Cheng, F. P., Voorhout, W. F., Marks, A., Colenbrander, B. et al. (2000). Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol Reprod Dev*, 55(3), 289-298.
- Verstegen, J. P., Onclin, K. & Iguer-Ouada, M. (2005). Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*, 64(3), 720-733.
- Volpe, S., Leoci, R., Aiudi, G. & Lacalandra, G. M. (2009). Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2, 275-278.
- Witte, T. S. & Schafer-Somi, S. (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 102(3-4), 181-193.
- Witte, T. S., Schafer-Somi, S., Kuchar, A., Mostl, E., Iben, C. & Aurich, C. (2009). Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 110(3-4), 293-305.
- Wu, J. T., Tsai, P. S., Lee, S. L. & Cheng, F. P. (2005). Characterisation of the progesterone receptor on canine spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 17(7), 733-741.
- Yu, I. & Leibo, S. P. (2002). Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 degrees C. *Theriogenology*, 57(3), 1179-1190.

## ANEXOS

Anexo I – Registos das avaliações efectuadas

**Tabela 7** - Registos dos vários parâmetros dos ejaculados frescos

	ejac.1	ejac.2	ejac.3	ejac.4	ejac.5	ejac.6	ejac.7	ejac.8	ejac.9
<b>Volume</b>	2,5	5	1	2,5	4,5	4,5	2	5,5	2,5
<b>Nº spz (x106)</b>	1337.0	1759.0	119.0	628.0	563.0	351.0	256.0	1485.0	408.0
<b>% motilidade progressiva</b>	98.0	82.0	95.0	93.0	92.0	92.0	90.0	92.0	95.0
<b>velocidade (classificada de 3-0)</b>	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>% spz vivos e morf. Normais</b>	85.0	92.0	81.0	85.0	83.0	92.0	79.0	87.0	80.0
<b>% defeitos cabeça</b>	2.0	0.0	1.0	2.0	4.0	1.0	6.0	4.0	2.0
<b>% defeitos p. intermédia</b>	1.0	1.0	3.0	1.0	0.0	1.0	1.0	5.0	0.0
<b>% defeitos cauda</b>	11.0	4.0	8.0	1.0	2.0	6.0	4.0	2.0	4.0

**Tabela 8** - Registos da percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva e rectilínea

ejaculado	diluidor	0h	24h	48h	72h	96h
1	ovo	81	76	72	59	45
1	leite 25	95	70	75	75	50
1	leite 50	77	54	60	67	59
2	ovo	86	85	85	80	60
2	leite 25	79	78	77	69	45
2	leite 50	86	88	76	65	40
3	ovo	90	83	77	60	29
3	leite 25	90	81	67	30	5
3	leite 50	-	-	-	-	-
4	ovo	86	82	80	80	69
4	leite 25	78	57	39	28	18
4	leite 50	82	61	56	24	3
5	ovo	86	92	91	75	78
5	leite 25	82	79	85	73	75
5	leite 50	82	80	82	74	66
6	ovo	85	88	87	80	60
6	leite 25	87	85	86	81	69
6	leite 50	92	82	72	76	61
7	ovo	92	88	81	64	58
7	leite 25	80	75	69	58	48
7	leite 50	78	76	70	59	32
8	ovo	90	80	75	68	70
8	leite 25	80	65	66	54	46
8	leite 50	81	55	50	40	36
9	ovo	80	80	50	34	23
9	leite 25	80	61	46	60	38
9	leite 50	83	62	54	47	26



**Tabela 9 – Registos da velocidade dos espermatozóides com motilidade**

<b>ejaculado</b>	<b>diluidor</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
1	ovo	3	3	3	2	2
1	leite 25	3	3	3	2	2
1	leite 50	3	3	3	2	2
2	ovo	3	3	2	2	1
2	leite 25	3	3	2	2	1
2	leite 50	-	-	-	-	-
3	ovo	3	3	3	2	1
3	leite 25	3	3	2	1	1
3	leite 50	3	2	2	2	1
4	ovo	3	3	2	2	2
4	leite 25	3	2	2	2	1
4	leite 50	3	2	2	2	1
5	ovo	3	3	2	2	2
5	leite 25	3	2	2	2	1
5	leite 50	3	3	3	2	2
6	ovo	3	3	3	2	1
6	leite 25	3	3	3	3	2
6	leite 50	3	3	3	3	2
7	ovo	3	3	2	2	1
7	leite 25	3	3	2	2	1
7	leite 50	3	3	2	2	1
8	ovo	3	2	2	2	2
8	leite 25	3	2	2	2	2
8	leite 50	3	2	2	2	1
9	ovo	3	3	2	2	1
9	leite 25	3	3	2	2	1
9	leite 50	3	3	2	2	1

**Tabela 10** - Registos da percentagem de espermatozóides vivos e com morfologia normal

<b>ejaculado</b>	<b>diluidor</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
1	ovo	92	87	74	64	54
1	leite 25	88	86	83	85	78
1	leite 50	89	94	82	84	70
2	ovo	94	95	89	86	79
2	leite 25	85	86	84	74	43
2	leite 50	91	89	90	85	81
3	ovo	88	85	83	82	80
3	leite 25	86	84	76	72	57
3	leite 50	-	-	-	-	-
4	ovo	86	88	78	84	85
4	leite 25	85	80	80	81	56
4	leite 50	67	53	53	58	54
5	ovo	85	80	86	85	84
5	leite 25	88	88	86	83	84
5	leite 50	83	86	85	77	69
6	ovo	93	88	84	87	83
6	leite 25	86	84	82	79	79
6	leite 50	86	85	83	78	74
7	ovo	83	82	88	73	78
7	leite 25	89	77	86	73	58
7	leite 50	83	67	68	79	56
8	ovo	86	71	70	76	75
8	leite 25	67	66	65	63	57
8	leite 50	59	60	59	58	52
9	ovo	81	68	69	63	64
9	leite 25	88	84	77	76	84
9	leite 50	80	76	85	72	75

**Tabela 11** – Registo da percentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (avaliados pelo teste hipo-osmótico)

<b>ejaculado</b>	<b>diluidor</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
1	ovo	85	85	59	61	44
1	leite 25	87	85	69	81	50
1	leite 50	89	94	82	84	70
2	ovo	91	89	86	84	69
2	leite 25	84	87	71	69	69
2	leite 50	91	89	90	85	81
3	ovo	84	68	72	78	58
3	leite 25	80	74	77	75	39
3	leite 50	-	-	-	-	-
4	ovo	77	72	64	81	70
4	leite 25	66	71	76	70	69
4	leite 50	67	53	53	58	54
5	ovo	84	79	70	56	72
5	leite 25	85	87	83	81	82
5	leite 50	83	86	85	77	69
6	ovo	87	74	83	70	62
6	leite 25	88	78	86	89	72
6	leite 50	86	85	83	78	74
7	ovo	83	63	53	63	51
7	leite 25	82	73	74	69	48
7	leite 50	83	67	68	79	56
8	ovo	63	79	70	70	68
8	leite 25	51	61	71	70	60
8	leite 50	59	60	59	58	52
9	ovo	83	74	75	69	63
9	leite 25	84	80	78	75	55
9	leite 50	80	76	85	72	75